

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΖΟΥΠΗ ΛΗΔΑ

**Βιοχημικοί μηχανισμοί φυλετικής διαφοροποίησης και stress:
Σχέση μεταξύ της έκφρασης της P450 αρωματάσης και του
εγκεφαλικού πεπτιδίου προ-οπιομελανοκορτίνη (POMC).**

Λάρισα 2005

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΖΟΥΠΗ ΛΗΔΑ

**Βιοχημικοί μηχανισμοί φυλετικής διαφοροποίησης και stress:
Σχέση μεταξύ της έκφρασης της P450 αρωματάσης και του
εγκεφαλικού πεπτιδίου προ-οπιομελανοκορτίνη (POMC).**

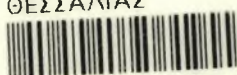
Λάρισα 2005



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4298/1
Ημερ. Εισ.: 09-03-2005
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΖΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087984

Η παρούσα διπλωματική εργασία έλαβε χώρα στις εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με υπεύθυνο εργαστηρίου τον κ. Μαμούρη Ζήση, επιβλέπουσα καθηγήτρια την κ. Μούτου Αικατερίνη και τριμελή επιτροπή τους :

Μαμούρη Ζήση

Αναπληρωτή καθηγητή, τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας

Μούτου Αικατερίνη

Επίκουρο καθηγήτρια, τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας

Σταθόπουλο Κωνσταντίνο

Επίκουρο καθηγητή , τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαμούρη για τη δυνατότητα εργασίας μου στον εργαστηριακό του χώρο, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν. Κυρίως όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, την κ. Μούτου για την ουσιαστική βοήθεια και υποστήριξή της, μέχρι και την τελευταία στιγμή.

Περιεχόμενα

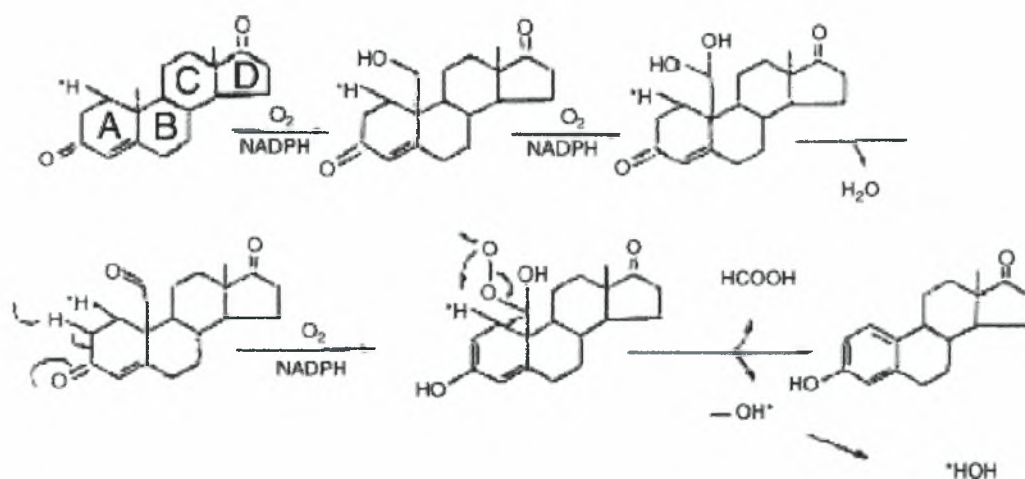
I. Εισαγωγή	1
1. Η P450 αρωματάση	1
2. Το γονίδιο cyp19 και η δομή του.....	2
3. Έκφραση των cyp19 γονιδίων.....	5
4. Stress και αναπαραγωγή	8
5. Προ-οπιομελανοκορτίνη (POMC).....	8
6. POMC, stress και αναπαραγωγή.....	10
II. Υλικά και μέθοδοι	13
1. Πειραματόζωα και ενυδρεία.....	13
2. Δειγματοληψίες.....	14
3. Απομόνωση RNA.....	14
4. Σύνθεση cDNA.....	15
5. Σχεδιασμός εκκινητών.....	15
6. Ενίσχυση και ταυτοποίηση προϊόντων.....	16
7. Ημι-ποσοτική PCR.....	18
III. Αποτελέσματα	20
1. β-Ακτίνη.....	20
2. 28SrRNA.....	20
3. P450 αρωματάση.....	22
4. POMC.....	22
5. Τα μόρια αναφοράς: β-ακτίνη και 28SrRNA.....	23
α. Εγκέφαλος.....	23
β. Γονάδες.....	25
6. Επίδραση στην έκφραση της P450 αρωματάσης και του POMC.....	26
α. P450 αρωματάση.....	26
β. POMC.....	29
IV. Συζήτηση	32
1. Τα μόρια αναφοράς: β-ακτίνη και 28SrRNA.....	32
2. P450 αρωματάση.	32
3. Προ-οπιομελανοκορτίνη (POMC).....	33
4. Φυλετική διαφοροποίηση των τελεόστεων και stress.....	33
V. Παράρτημα.....	37
VI. Βιβλιογραφία.....	39

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η P450 αρωμάτωση

Οι αναπαραγωγικές, στεροειδείς ορμόνες (ανδρογόνα, οιστρογόνα και προγεστερονοειδή) εμφανίζουν ένα «πολυσχιδή χαρακτήρα», καθώς φαίνεται όλο και περισσότερο να εμπλέκονται σε πληθώρα φυσιολογικών καταστάσεων, όπως είναι η έναρξη της εφηβείας, η ανάπτυξη των γαμετών, η έκφραση σεξουαλικά διμορφικών χαρακτηριστικών και η εμφάνιση των διαφόρων αναπαραγωγικών συμπεριφορών σε πληθώρα σπονδυλωτών. Οι ποσοτικές διακυμάνσεις στα επίπεδα των στεροειδών ορμονών και στις διάφορες χρονικές περιόδους καθορίζουν την επιτυχία ή μη της αναπαραγωγής και αντανακλούν τις μεταβολές ενός ή περισσότερων στεροειδογενικών ενζύμων.

Ένα σημαντικό ενζυμικό σύμπλοκο στο μονοπάτι της στεροειδογένεσης είναι της P450 αρωμάτωσης. Αποτελείται από μια εξειδικευμένη μορφή μικροσωμικού P450 κυτοχρώματος, του κυτοχρώματος P450 αρωμάτωσης -(P450_{AROM})- και από τη φλαβοπρωτεΐνη NADPH-κυτοχρωμική P450 αναγωγάση. Ο ρόλος αυτού του ενζυμικού συμπλόκου είναι η μετατροπή των ανδρογόνων (τεστοστερόνη και ανδροστενεδιόνη) σε οιστρογόνα (οιστραδιόλη 17-β και οιστρόνη) μέσω της αρωματοποίησης του α-δακτυλίου των C19 στεροειδών. Η αντίδραση, η οποία θεωρείται μία πολύ-λειτουργική αντίδραση οξειδάσης (Lephart, 1996), λαμβάνει χώρα στη μεμβράνη του λείου ενδοπλασματικού δικτύου αρκετών στεροειδογενικών κυττάρων (Conley and Walters, 1999), ενώ απαιτεί 3 γραμμομόρια οξυγόνου και NADPH για κάθε γραμμομόριο οιστρογόνου που παράγεται, με ταυτόχρονη απελευθέρωση 1 γραμμομόριο νερού (Εικ. 1).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης των οιστρογόνων μέσω της αρωματοποίησης των C19 ανδρογόνων. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ανηγμένα ισοδύναμα από το NADPH μεταφέρονται μέσω της φλαβοπρωτεΐνης στο κυτοχρωμα P450 αρωμάτωση, το οποίο προσδένει το υπόστρωμα

(ανδρογόνο) και εισάγει το οξυγόνο στο εσωτερικό του μορίου. Στην εικόνα απεικονίζεται μια συνεχής υδροξυλίωση τριών βημάτων όπου το υπόστρωμα είναι η ανδροστενεδιόνη και το τελικό προϊόν η οιστρόνη. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η C19 μεθυλική ομάδα απομακρύνεται ως φορμικό οξύ, ενώ ακολουθεί η αρωματοποίηση του α-δακτυλίου προς μια δομή φαινολικού δακτυλίου. (Lephart, 1996; Tong *et al*, 2001).

2. Το γονίδιο cyp19 και η δομή του

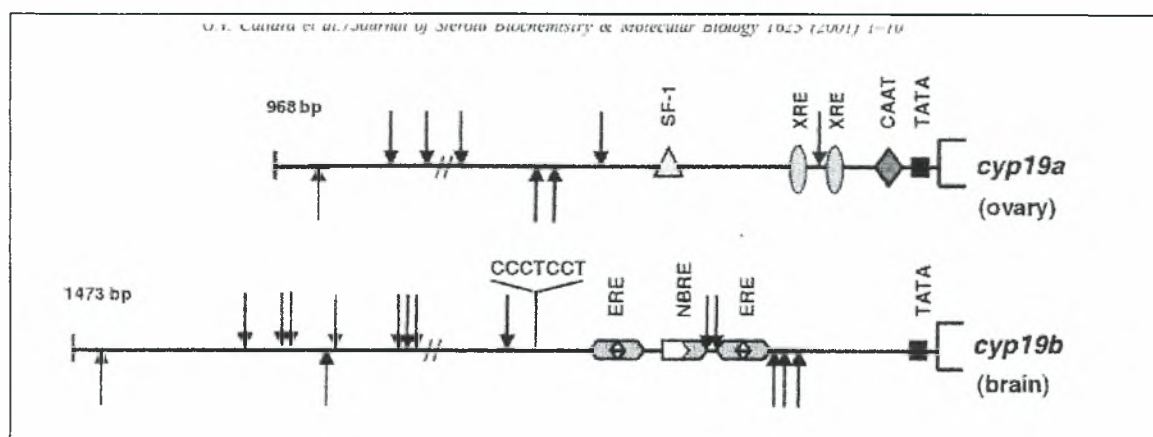
Η P450 αρωματάση ανήκει σε μία υπεροικογένεια ενζύμων που υδροξυλιώνει λιπόφιλα υποστρώματα εισάγοντας μοριακό οξυγόνο και που φαίνεται να αποκλίνει εξελικτικά νωρίτερα από τα υπόλοιπα στεροειδογενικά κυτοχρώματα P450 (Nebert 1987; Nelson *et al.*, 1993). Η P450 αρωματάση κωδικοποιείται από το γονίδιο cyp19 το οποίο εκφράζεται στα περισσότερα μέχρι σήμερα μελετημένα σπονδυλωτά. Ανάλογα με το είδος και την εξελικτική θέση των σπονδυλωτών παρατηρούνται διαφορές όσον αφορά στον αριθμό των γενετικών τόπων και τον τρόπο έκφρασής του ώστε να παράγει λειτουργικό ένζυμο.

Στα περισσότερα ανώτερα σπονδυλωτά (άνθρωπος, ποντίκι) καθώς και στους ελασμοβράγχους, το cyp19 εμφανίζεται ως μοναδικό αντίγραφο στο απλοειδές γένωμα με ένα μεγάλο αριθμό προαγωγών και πρώτων εξονίων που καθορίζουν και την περαιτέρω έκφραση της P450 αρωματάσης. Τα καταγεγραμμένα μεγέθη του γονιδίου κυμαίνονται από 1,7 έως 3,1kb περίπου, ενώ φαίνεται να εκφράζει μία γοναδική μορφή της P450 αρωματάσης και μία έξω-γοναδική ή εγκεφαλική μορφή. Το μέγεθος του πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου καταλαμβάνει περίπου τις 1,5 kb, μια περιοχή η οποία κωδικοποιεί για τα πιο σημαντικά λειτουργικά τμήματα του ενζύμου, αλλά και τα πιο συντηρημένα εξελικτικά, όπως η περιοχή πρόσδεσης της αίμης, η Ι-έλικα, το Οζολικό πεπτίδιο και η αρωματική περιοχή. Τα διάφορα μεγέθη των μεταγράφων που εμφανίζονται φαίνεται να σχετίζονται με την ιστο-ειδική έκφραση του ενζύμου και οφείλονται είτε στην απόσταση του εκάστοτε ενεργοποιημένου προαγωγέα από το πλαίσιο ανάγνωσης στην 5' αμετάφραστη περιοχή (5'-UTR), είτε στην απόσταση του σήματος πολυαδενιλίωσης από το πλαίσιο ανάγνωσης στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR). (Ijiri *et al.*, 2000 ; Simpson *et al.*, 1994).

Στους χοίρους από την άλλη πλευρά, έχουμε την ύπαρξη πολλαπλών cyp19 γονιδίων (Corbin *et al.*, 1995; Choi *et al*, 1997), κάτι που συμβαίνει και σε αρκετά είδη ψαριών (Tchoudakova and Callard, 1998; Kishida and Callard, 2001).

Τα ψάρια αλλά κυρίως οι τελεόστοι ιχθύες αποτέλεσαν και συνεχίζουν να αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για τη μελέτη της δομής του γονιδίου της P450 αρωματάσης. Η συγκεκριμένη τάξη ψαριών χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά υψηλά επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας της αρωματάσης στον εγκέφαλο, σε βαθμό που ξεπερνούν 100-1000 φορές το επίπεδο της δραστηριότητας στον εγκέφαλο των θηλαστικών (Callard *et al.*, 1990). Η

βιολογική σημασία αυτού του φαινομένου δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, αλλά αρκετές πιθανές εξηγήσεις έχουν δοθεί μέχρι στιγμής, όπως αυτή της νευροπροστασίας (García-Segura *et al.*, 2001) και της νευρογένεσης (Callard *et al.*, 2001). Η ικανότητα γέννησης των νευρικών κυττάρων είναι ένα χαρακτηριστικό των ιχθύων που συμβαίνει σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους και φαίνεται να σχετίζεται με το υψηλό περιεχόμενο της P450 αρωματάσης και συνεπώς με τα υψηλά επίπεδα οιστραδιόλης στον εγκέφαλο. Υψηλά επίπεδα mRNA και υψηλή δράση της P450 αρωματάσης έχουν όντως παρατηρηθεί σε διάφορα ψάρια όπως στο χρυσόψαρο *Carassius auratus* (Gelinas *et al.*, 1998), στο *Porichthys notatus* (Forlano *et al.*, 2001), στην πέστροφα *Onchorhynchus mykiss* (Menuet *et al.*, 2001) και στο *Danio rerio* (Kishida and Callard, 2001).



Εικόνα 2: Διάγραμμα της δομής και των θεωρητικών ρυθμιστικών στοιχείων στους προαγωγείς των *cyp19a* και *cyp19b* γονιδίων, (5'-UTR), του χρυσόψαρου (*Carassius auratus*). Στο *cyp19b* γονίδιο, διαφαίνονται δύο στοιχεία απόκρισης σε οιστρογόνα (ERE- Estrogen Responsive Elements), TATA box, δεκαπέντε αντίγραφα του SRY/SOX μοτίβου (το SRY γονίδιο θεωρείται υπεύθυνο για τον καθορισμό των όρχεων) καθώς και η αλληλουχία CCCTCCT (νευρο-ειδική αλληλουχία πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GATA-2). Στο *cyp19a* γονίδιο διακρίνονται CAAT και TATA boxes, θέση πρόσδεσης του στεροειδογενικού παράγοντα SF-1, αναγνωρίσιμες αλληλουχίες για την πρόσδεση του ετεροδιμερούς AhR/ARNT (aryl hydrocarbon receptor/nuclear translocation factor) και οκτώ αντίγραφα του SRY/SOX μοτίβου (Callard *et al.*, 2001).

Στους τελεόστεους, το μέγεθος των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις διάφορες μορφές της P450 αρωματάσης κυμαίνεται από 1,8kb έως 2,4kb. Έχουν χαρακτηριστεί δύο γενετικοί τόποι του *cyp19* γονιδίου. Ο ένας, *cyp19b*, κωδικοποιεί για την εγκεφαλική ή εξω-γοναδική μορφή της P450 αρωματάσης (P450aromB), ενώ τουλάχιστον δύο αλληλόμορφα του γονιδίου *cyp19a*, κωδικοποιούν για την γοναδική μορφή αυτής (P450aromA), (Callard *et al.*, 2001).

Στους τελεόστεους *Carassius auratus* και *Danio rerio*, το γονίδιο που κωδικοποιεί για την εγκεφαλική μορφή έχει μέγεθος ~ 3kb, με τα 1,5kb να αποτελούν το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και να κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 518 αμινοξέων και μοριακού βάρους 58,7KDa. Τα ρυθμιστικά στοιχεία της 5'-UTR απεικονίζονται στην Εικ.2. Η 3'-UTR του

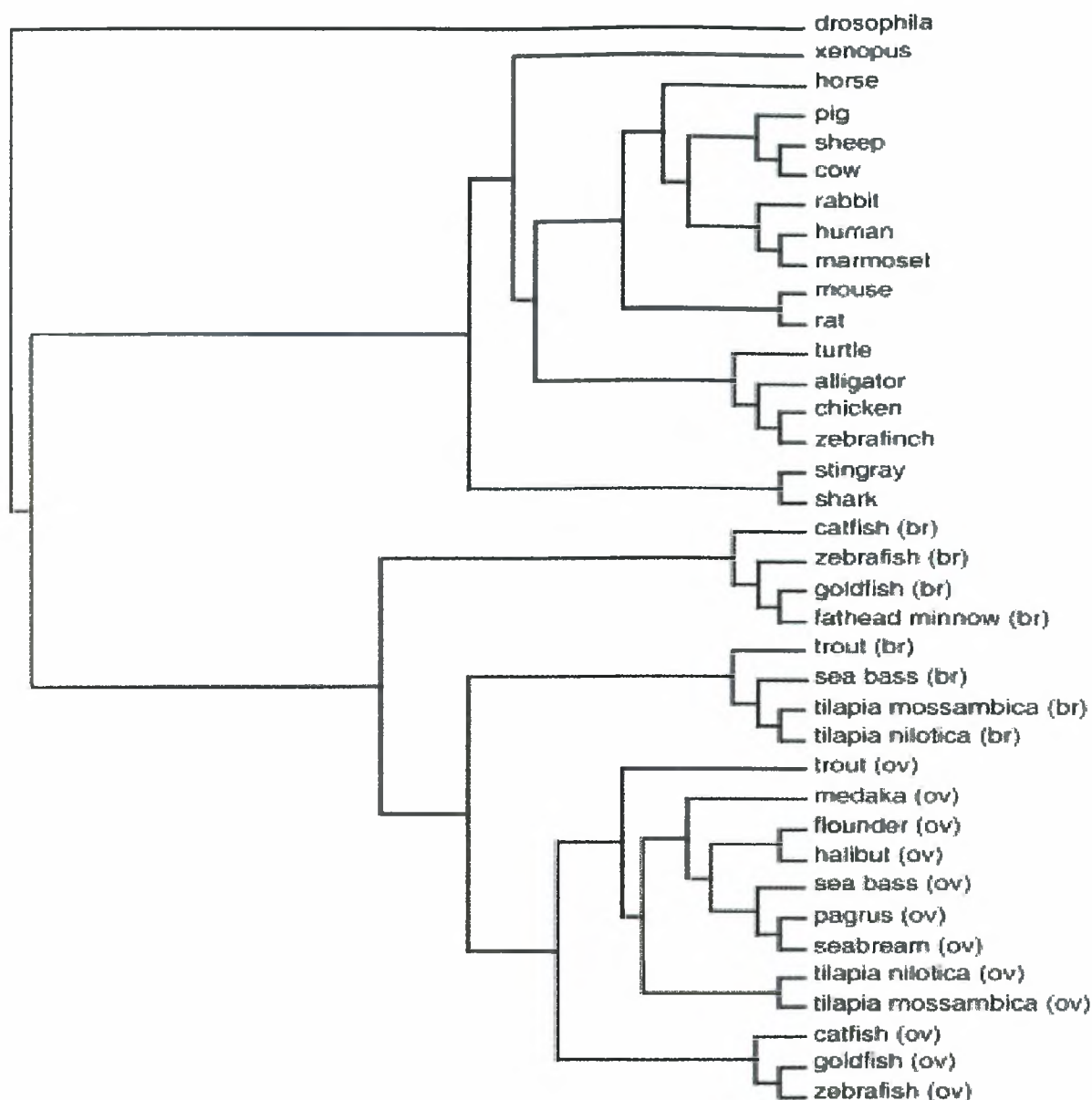
γονιδίου είναι μεγαλύτερη από αυτή που εμφανίζει το *cyp19a* και φέρει 5 θεωρητικά σήματα πολυαδενυλίωσης (Callard *et al.*, 2001).

Το γονίδιο της γοναδικής μορφής της P450 αρωματάσης, *cyp19a*, έχει μέγεθος 1,9 kb περίπου με ένα πλαίσιο ανάγνωσης 1,5 kb που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 510 αμινοξέων και μοριακού βάρους 51,0KDa. Όπως φαίνεται και στην Εικ.2, η 5'-UTR φέρει μια θέση πρόσδεσης του στεροειδογενικού παράγοντα SF-1. Αξίζει να σημειωθεί ότι πρόσδεση του SF-1 ελέγχει μέσω του κυκλικού AMP (cAMP) τα επίπεδα έκφρασης της αρωματάσης τόσο στους ανθρώπους όσο και στους αρουραίους. Η 3'-UTR από τη μεριά της φέρει δυο μόνο σήματα πολυαδενυλίωσης (Callard *et al.*, 2001).

Στο χρυσόψαρο *Carassius auratus* παρατηρήθηκε ότι στην ανά ζεύγη σύγκριση των απομονωμένων κλώνων του *cyp19a* γονιδίου εμφανίστηκαν αντικαταστάσεις, ελλείψεις και παρεμβολές νουκλεοτιδίων σε ποσοστό 10-15%. Το φαινόμενο αυτό σε συνδυασμό με την εμφάνιση πολλαπλών αντιγράφων σε κατά Southern αποτυπώσεις αποτελούν ενδείξεις της ύπαρξης δυο ή περισσότερων *cyp19a* γονιδίων (Tchoudakova and Callard, 1998).

Ένα ακόμη είδος τελεόστεου που εμφανίζει δύο γονίδια *cyp19* για την έκφραση των δύο ισομορφών της P450 αρωματάσης είναι και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax* L.). Σ' αυτό η γοναδική μορφή του *cyp19* έχει μέγεθος ~1.8kb και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 517 αμινοξέων και μοριακού βάρους 58,5KDa (Dalla Valle *et al.*, 2002), ενώ το γονίδιο της εγκεφαλικής μορφής έχει μέγεθος ~2.3kb και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 505 αμινοξέων και μοριακού βάρους 57,2KDa (Blázquez and Piferrer, 2004).

Τα γονίδια αυτά εμφανίζουν ένα μεγάλο ποσοστό επικάλυψης και συντήρησης όσον αφορά την έκφραση βασικών για την καταλυτική ικανότητα του ενζύμου, περιοχών, αλλά και ουσιώδεις διαφορές που σχετίζονται με τον ιστό στον οποίο πρόκειται να εκφραστεί η εκάστοτε ισομορφή, αλλά και με το είδος και την εξελικτική θέση του. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο των ισομορφών της P450 αρωματάσης. Σ' αυτό εμφανίζονται δύο κύριοι κλάδοι. Ο ένας ομαδοποιεί τους τελεόστεους ιχθύες, ενώ ο άλλος κλάδος ομαδοποιεί τετράποδα και χονδριχθύες. Οι τελεόστεοι με τη σειρά τους κατηγοριοποιούνται σε δύο καλά διαχωρισμένους κλάδους, ο ένας εκ των οποίων περιέχει τις παραλλαγές της εγκεφαλικής μορφής της P450 αρωματάσης και ο άλλος την γοναδική μορφή (Blázquez and Piferrer, 2004).



Εικόνα 3: Φυλογενετικό δέντρο των πρωτεϊνών της P450 αρωματάσης των σπονδυλωτών (Blázquez and Piferrer, 2004).

3. Έκφραση των *cyp19* γονιδίων

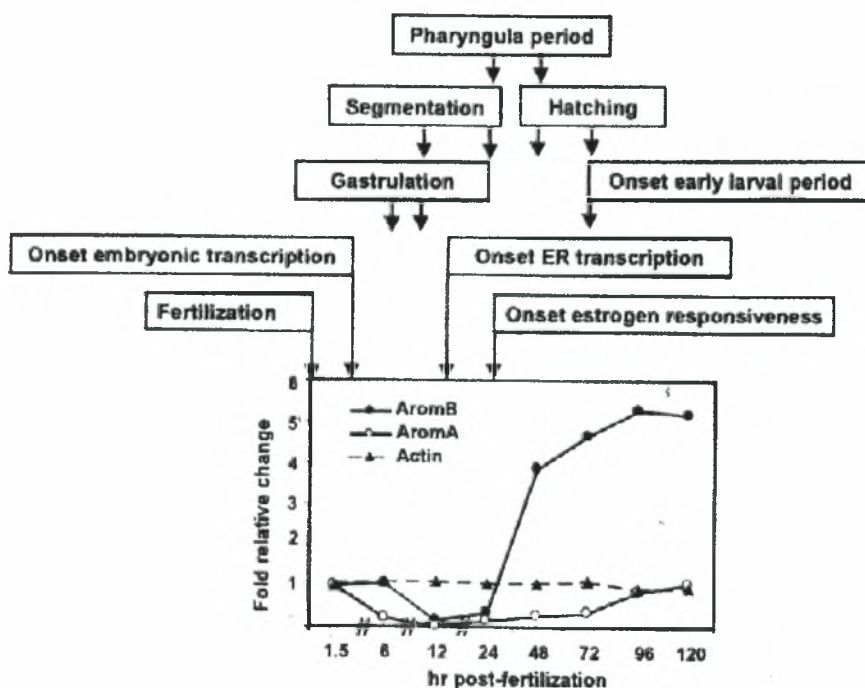
Η έκφραση του *cyp19* και επομένως της P450 αρωματάσης πραγματοποιείται τόσο στον εγκέφαλο όσο και στις γονάδες. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί η έκφραση του *cyp19* σε μια ποικιλία ιστών όπως ο πλακούντας, το ήπαρ, οι νεφροί, ο λιπώδης ιστός και ο πεπτικός σωλήνας στα διάφορα είδη των σπονδυλωτών (Simpson *et al.*, 2002).

Στα περισσότερα θηλαστικά, όπως προαναφέρθηκε, το *cyp19* γονίδιο εμφανίζεται ως ένα μόνο αντίγραφο στο απλοειδές γένωμα και η ιστο-ειδική έκφραση της P450 αρωματάσης επιτυγχάνεται μέσω της διαδικασίας του εναλλακτικού ματίσματος ή/και μέσω της ενεργοποίησης διαφορετικών προαγωγέων, ειδικών για κάθε ιστό (Harada *et al.*, 1993; Simpson *et al.*, 1997; Golovine *et al.*, 2003).

Παρόμοιος τρόπος ρύθμισης εμφανίζεται και στο σαλάχι του Ατλαντικού *Dasyatis Sabina* (Ijiri *et al.*, 2000). Το συγκεκριμένο είδος ανήκει στους ελασμοβράγχους, οι οποίοι απέκλιναν από τα υπόλοιπα σπονδυλωτά πριν από περισσότερο από 350 εκατομμύρια χρόνια και επομένως είναι πιθανό να φέρουν μια αρχέγονη μορφή του συγκεκριμένου γονιδίου.

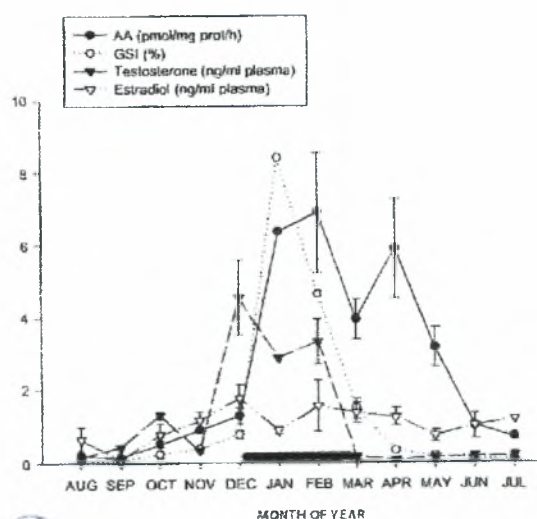
Στους τελεόστεους έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη δύο διαφορετικών ισομορφών τόσο δομικά όσο και λειτουργικά. Στη βιβλιογραφία εμφανίζονται συνήθως με τα ονόματα P450aromA και P450aromB που αντιστοιχούν στη γοναδική και εγκεφαλική μορφή αντίστοιχα. (Tchoudakova and Callard, 1998; Kishida and Callard, 2001; Callard *et al.*, 2001). Στο λαβράκι, έκφραση της P450aromA έχει διαπιστωθεί στις γονάδες και στον εγκέφαλο των θηλυκών, αλλά όχι σε άλλους ιστούς όπως ο εγκέφαλος των αρσενικών, το ήπαρ, η καρδιά κ.λ.π. (Dalla Valle *et al.*, 2002). Αντίθετα η εγκεφαλική μορφή, P450aromB, εμφανίζεται σε αρκετά μεγάλο εύρος περιοχών του εγκεφάλου (κυρίως στον πρόσθιο εγκέφαλο: τελεγκέφαλο, υποθάλαμο, οσφρητικό λοβό αλλά και σε περιορισμένες ποσότητες σε μέσο και οπίσθιο εγκέφαλο), στην υπόφυση, αλλά και στις γονάδες και τους νεφρούς (Blázquez and Piferrer, 2004).

Μετάγραφα και των δύο ισομορφών εμφανίζονται νωρίς κατά την ανάπτυξη (Εικ.4). Στο *Danio rerio* και τα δύο μετάγραφα της P450 αρωματάσης ανιχνεύονται στα πρώτα στάδια μετά τη γονιμοποίηση. Στη συνέχεια το σήμα των γονιδίων αρχίζει να ελαττώνεται μέχρι και τη δωδέκατη ώρα μετά την γονιμοποίηση όπου και φτάνει στην ελάχιστη τιμή του. Το μοτίβο αυτό δηλώνει συνήθως τη μεταφορά και αποσύνθεση των μητρικών mRNA. Η περίοδος από την 12η-24η ώρα μετά τη γονιμοποίηση χαρακτηρίζεται και ως φάση μεταμερισμού, περίοδος κατά την οποία λαμβάνουν χώρα η μετανάστευση των πρώιμων βλαστητικών κυττάρων στις θέσεις ανάπτυξης των γονάδων και η διαφοροποίηση του κεντρικού νευρικού συστήματος. Καθώς αναπτύσσονται το κεντρικό νευρικό σύστημα και οι γονάδες, τα επίπεδα του mRNA των δυο μορφών της αρωματάσης αυξάνονται σημαντικά λίγο πριν την εκκόλαψη μέχρι και τα αρχικά προνυμφικά στάδια, με τη συγκέντρωση της P450aromB να εμφανίζει απότομη αύξηση και είναι μέχρι και 15 φορές μεγαλύτερη απ' ότι της A ισομορφής (Callard *et al.*, 2001).



Εικόνα 4: Χρονική έκφραση των *cyp19* γονιδίων σε σχέση με τα αναπτυξιακά γεγονότα στον τελεόστεο *Danio rerio* (Callard *et al.*, 2001).

Η P450 αρωματάση εκφράζεται σε νέα άτομα αλλά κυρίως σε άτομα στα οποία έχει επέλθει η περίοδος της σεξουαλικής τους ωριμότητας. (González and Piferrer, 2003). Στον εγκέφαλο του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*), η δράση της P450 αρωματάσης παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις στη διάρκεια του χρόνου. Οι αλλαγές στην ενζυμική δραστηριότητα σχετίζονται με τα ποσοστά των στεροειδών ορμονών, τεστοστερόνης και οιστραδιόλης, καθώς και με το γοναδοσωματικό δείκτη (GSI). Οι μεγαλύτερες τιμές παρατηρούνται κατά την περίοδο της ωοτοκίας από το Δεκέμβριο μέχρι το Μάρτιο (González and Piferrer, 2003).



Εικόνα 5: Αλλαγές στην ενζυμική δραστηριότητα της P450 αρωματάσης του εγκεφάλου στο λαβράκι κατά τη διάρκεια του έτους. Η μαύρη οριζόντια γραμμή δηλώνει τη διάρκεια της περιόδου ωοτοκίας στη Μεσόγειο (González and Piferrer, 2003).

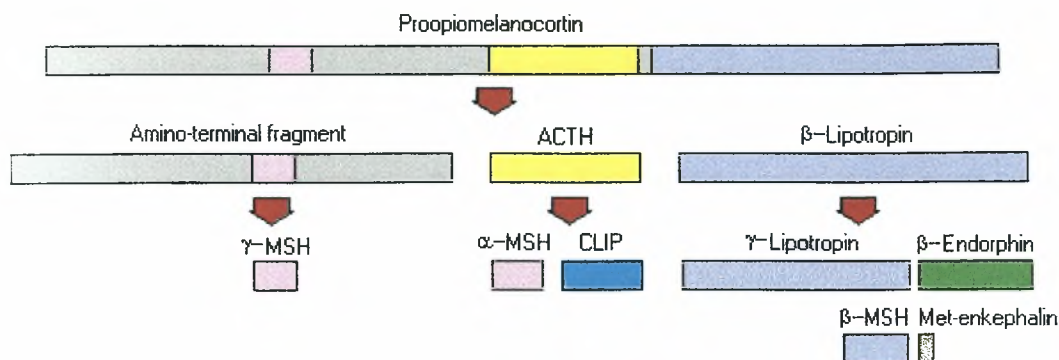
4. Stress και αναπαραγωγή

Σε καταστάσεις stress, τα υψηλά επίπεδα κορτιζόλης για εκτεταμένα χρονικά διαστήματα, έχουν αρνητικές συνέπειες στην αύξηση και την αναπαραγωγή των ψαριών (Barton and Iwama, 1991; Wendelaar-Bonga, 1997). Τα γλυκοκορτικοειδή συμπεριλαμβανομένης της κορτιζόλης, αναστέλλουν την αναπαραγωγική διαδικασία, συμμετέχοντας σε μηχανισμούς ικανούς να καθυστερήσουν την αναπαραγωγή κατά τη διάρκεια του stress, οποιουδήποτε τύπου. Στα ψάρια, η χορήγηση εξωγενούς κορτιζόλης οδηγεί σε μείωση των φυσιολογικών επιπέδων της τεστοστερόνης (T) και της 11-κετοτεστοστερόνης (βασικό ανδρογόνο των ψαριών, 11-KT) στο πλάσμα του αίματος. Επίσης μειωμένα επίπεδα εμφανίζει και η οιστραδιόλη (E), αν και σε μικρότερο βαθμό απ' ό,τι τα ανδρογόνα, με 30% περίπου μείωση στην ικανότητα πρόσδεσής της στο ήπαρ (Pottinger et al., 1995, 1996; Pottinger and Pickering, 1990) και ταυτόχρονη αύξηση της ικανότητας πρόσδεσης στις πρωτεΐνες του πλάσματος.

5. Προ- οπιομελανοκορτίνη (POMC)

Ο εγκέφαλος των σπονδυλωτών διαθέτει την ικανότητα ελέγχου της απόκρισης στο stress μέσω πολυάριθμων, υψηλά οργανωμένων νευροενδοκρινών δομών. Ο έλεγχος περιλαμβάνει πλήθος μονοπατιών και ενδιάμεσων προϊόντων που ενεργοποιούνται ύστερα από τη δράση του στρεσογόνου παράγοντα. Η ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια ενεργοποιεί την παραγωγή και έκκριση του εγκεφαλικού πεπτιδίου προ-οπιομελανοκορτίνη (POMC), με σκοπό τη ρύθμιση της απόκρισης στο stress (Wendelaar Bonga, 1997; Slominski et al. 2000). Το POMC είναι μια πρόδρομη ένωση που παράγεται στα κορτικότροπα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης (pars distalis) και στα μελανότροπα κύτταρα της ενδιάμεσης υπόφυσης (pars intermedia). Το mRNA του POMC μεταφράζεται σε ένα μόνο πρωτεϊνικό προϊόν που αποτελεί τον πρόδρομο της επινεφριδοφλοιοτρόπου ορμόνης (ACTH), των ενδορφινών, των ορμονών ενεργοποίησης των μελανοκυττάρων (MSH) και των λιποτροπινών (Smith and Funder, 1988). (Εικ.6).

Τα τελικά προϊόντα απελευθερώνονται μέσω μιας επιτυχημένης κυτταροειδικής διαδικασίας και μετα-μεταφραστικών μεταβολών που περιλαμβάνουν: ενδο- και εξω-πεπτιδική, πρωτεολυτική αποκοπή σε θέσεις όπου εδράζουν ανά ζεύγη βασικά αμινοξέα και που βρίσκονται πλευρικά στις εκάστοτε αλληλουχίες των πεπτιδικών ορμονών, αμιδίαση (amidation) και ακετυλίωση (Slominski et al. 2000).



Εικόνα 6: Το POMC και τα προϊόντα του (<http://www-klinik.uni-maiz.de/zentrallabor/Lab-Web/Hypertextbook/>).

Το μέγεθος του γονιδίου που κωδικοποιεί για το POMC εμφανίζει ένα εύρος μεγέθους στα διάφορα εξεταζόμενα είδη από 1000bp στα τετράποδα (Nakanishi *et al.*, 1979; Martens *et al.*, 1985; Hilario *et al.*, 1990) έως 1800bp στην πέστροφα (Salbert *et al.*, 1992). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες μεγέθους 255-280 αμινοξέα. Πιο συγκεκριμένα, το POMC γονίδιο εμφανίζει τις εξής αλληλουχίες: μία αμινοτελική περιοχή, μία γ-MSH περιοχή (περιοχή που δεν εμφανίζεται σε όλα τα είδη σπονδυλωτών), ένα πεπτίδιο σύνδεσης, μία ACTH περιοχή, μία γ-LPH περιοχή, μία περιοχή β-MSH και μία περιοχή της β-ενδορφίνης (Εικ.6).

Γενικά, τα τμήματα του POMC γονιδίου με το μεγαλύτερο ποσοστό συντήρησης είναι εκείνα της ACTH και των α-και β-MSH. Μια λιγότερο συντηρημένη περιοχή του POMC γονιδίου είναι αυτή που κωδικοποιεί για τα προϊόντα της β-ενδορφίνης και που εντοπίζεται στην καρβοξυτελική περιοχή. Εντός της αλληλουχίας αυτής υπάρχει μία σειρά αμινοξέων (E,R,S,Q) η οποία χαρακτηρίζεται και ως αλληλουχία μονοβασικής θέσης κοπής (Dores *et al.*, 1994b). Λόγω πέψης στη θέση αυτή εμφανίζονται «κουτσουρεμένα» προϊόντα της β-ενδορφίνης. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της β-ενδορφίνης είναι N-ακετυλιωμένο.

Η αλληλουχία της γ-MSH αποτελεί αντικείμενο έρευνας λόγω της ποικιλομορφίας που παρουσιάζει στα διάφορα είδη. Τα δομικά χαρακτηριστικά αυτής μελετώνται εκτεταμένα, ενώ ερωτήματα εγείρονται για την βιολογική σημασία της πεπτιδικής αυτής ορμόνης και για την εξέλιξή της. Για παράδειγμα, σε ψάρια τα οποία εξελίχθηκαν αρκετά νωρίς όπως ο οξύρυγχος του γένους *Acipenser* (Amemiya *et al.*, 1997) και το είδος *Lepisosteus osseus* (Dores *et al.*, 1997), η γ-MSH εμφανίζεται ως κατάλοιπο, ενώ εξαφανίζεται σε πιο εξελισσόμενα ψάρια όπως οι τελεόστεοι (Kawauchi *et al.*, 1981; Kitahara *et al.*, 1987; Salbert *et al.*, 1992; Okuta *et al.*, 1996; Arends *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2000). Πιο

συγκεκριμένα, στην πρώτη κατηγορία ψαριών, τόσο οι θεωρούμενες πρωτεολυτικές θέσεις κοπής όσο και η βασική MSH αλληλουχία, έχουν υποστεί υποκαταστάσεις κάτι που υποδεικνύει τη μικρή ή και καθόλου λειτουργική σημασία αυτής της πεπτιδικής ορμόνης στους ακτινοπετερύγιους (Dores *et al.*, 1997). Το αντίθετο συμβαίνει στους σαρκοπετερύγιους οργανισμούς, όπου η γ-MSH έχει απομονωθεί από την υπόφυση, σε διάφορα είδη (Nakanishi *et al.*, 1979; Kawauchi, 1988; van Strein *et al.*, 1996; Amemiya *et al.*, 1999a; Dores *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999).

Σε όλα τα σπονδυλωτά το POMC γονίδιο περιέχει αλληλουχίες που κωδικοποιούν για την α-MSH και την ACTH, την β-MSH και αλληλουχίες των προϊόντων της β-ενδορφίνης. Στα τετράποδα, τα POMC γονίδια περιέχουν και αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τη γ-LPH και την γ-MSH ενώ πρόσφατα, εντοπίστηκε και μια ακόμα MSH μορφή (δ-MSH) η οποία όμως περιορίζεται στην υπερ-οικογένεια των ελασμοβράγχων (Danielson *et al.*, 1999; Amemiya *et al.*, 2000).

Το γονίδιο της προ-οπιομελανοκορτίνης εντοπίζεται πολύ νωρίς στην ιστορία της εξέλιξης των χορδωτών και έχει υποστεί μετατροπές συγκεκριμένες για κάθε γενεαλογία των σπονδυλωτών (Danielson and Dores, 1999). Σε γενικές γραμμές, τα θηλαστικά μεταγράφουν ένα μόνο POMC γονίδιο στο απλοειδές γένωμα (Drouin *et al.*, 1989). Σε μερικά είδη κατώτερων σπονδυλωτών, όπως σε ψάρια, παρατηρείται η έκφραση δύο POMC γονιδίων με διαφορετικό βαθμό ομολογίας ανάλογα με το είδος.

Ένα γενικό εξελικτικό πλαίσιο του POMC γονιδίου στα σπονδυλωτά έχει αναπτυχθεί. Από τα άγναθα και μετά, η γενική οργάνωση του συγκεκριμένου γονιδίου περιλαμβάνει μία α-MSH/ACTH περιοχή, μία β-MSH περιοχή και μία περιοχή β-ενδορφίνης. (Takashi *et al.*, 1995; Heinig *et al.*, 1995). Με την εμφάνιση των γναθόστομων, ένας επιπρόσθετος διπλασιασμός έλαβε χώρα στην MSH περιοχή και έτσι προστέθηκε και η γ-MSH περιοχή στο POMC γονίδιο (Amemiya *et al.*, 1997; Dores *et al.*, 1997; Alrubaian *et al.*, 1999). Κατά το διαχωρισμό των ακτινοπετεργίων από τους σαρκοπετερύγιους, οι πολλαπλές περιοχές των πεπτιδικών ορμονών υπέστησαν πληθώρα μεταβολών ειδικών για κάθε γενιά και διαφορετικού βαθμού (Dores *et al.*, 1999).

6. POMC, stress και αναπαραγωγή

Τα νευροπεπτίδια είναι κύριοι ρυθμιστές της αναπαραγωγής. Ελάχιστα είναι τα πεπτίδια τα οποία εμπλέκονται σε τόσες φάσεις της αναπαραγωγικής διαδικασίας όσο τα οπιοειδή, τα

οποία εμπλέκονται στην διατήρηση του ορμονικού κύκλου και στην σεξουαλική συμπεριφορά, τόσο σε αρσενικά, όσο και σε θηλυκά άτομα (Hammer *et al.*, 1994).

Ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια (HPA axis) στα θηλαστικά, όπως και ο αντίστοιχος άξονας των τελεόστεων (HPI axis), αποτελείται από μια σειρά ορμονικών μονοπατιών, των οποίων τα σημαντικότερα συστατικά είναι ο υποθαλαμικός παράγοντας απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRF), η ACTH της υπόφυσης και η κορτιζόλη των επινεφριδίων. Η απελευθέρωση των κορτικοστεροειδών διεγείρεται από την έκκριση της ACTH της υπόφυσης, που με τη σειρά της ρυθμίζεται από τον CRF παράγοντα. Μία τέτοια διαδικασία ενεργοποιείται ως απόκριση σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες. Η αύξηση της κορτιζόλης στο αίμα έχει σαν αποτέλεσμα ο οργανισμός να βρίσκεται σε εγρήγορση με σκοπό την διατήρηση της ομοιόστασής του, έναντι σε οποιαδήποτε περιβαλλοντική ή φυσιολογική αλλαγή (Winberg and Lepage, 1998).

Όπως τα περισσότερα ενδοκρινικά συστήματα ο παραπάνω άξονας είναι δεκτικός σε ρύθμιση μέσω ανάδρασης (feedback control) και επομένως προκύπτει ότι υψηλά επίπεδα κορτιζόλης είναι σε θέση να αναστείλουν τη δράση του HPA ή HPI άξονα. (Winberg and Lepage, 1998). Παρόλα αυτά, έχει αποδειχτεί ότι η απόκριση του HPA άξονα καθώς και τα επίπεδα των προϊόντων του POMC στο πλάσμα κατά τη διάρκεια του stress μπορεί να αλλάζει ανάλογα με τη φύση του ερεθίσματος, την ένταση και τη διάρκειά του (Balm and Pottinger, 1995; Winberg and Lepage, 1998). Επιπρόσθετα, υπάρχουν ενδείξεις για προσαρμογή ή απευαισθητοποίηση της απόκρισης της ACTH στο αντίστοιχο ερέθισμα (Balm and Pottinger, 1995; Škultétyová and Ježová, 1999; Levine, 2000).

Τα επίπεδα του mRNA του POMC έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνουν μετά από έκθεση σε στρεσογόνο παράγοντα και μετά το πέρας ορισμένου χρονικού διαστήματος (Winberg and Lepage, 1998; Škultétyová and Ježová, 1999). Η καθυστέρηση αυτή που παρατηρείται έχει αποδοθεί στις διάφορες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα στο συγκεκριμένο νεύρο-πεπτίδιο. Τα επίπεδα των μεταγράφων φαίνεται να παραμένουν υψηλά ακόμα κι όταν τόσο τα επίπεδα κορτιζόλης όσο και τα επίπεδα του CRF έχουν επιστρέψει σε φυσιολογικά επίπεδα (Winberg and Lepage, 1998; Škultétyová and Ježová, 1999).

Αμφιλεγόμενα είναι τα πρότυπα ρύθμισης των μελανοτροπικών POMC προϊόντων στο πλάσμα σε καταστάσεις stress, όπως προκύπτει από πειράματα που έχουν διεξαχθεί σε διαφορετικά είδη ψαριών (Sumpter *et al.*, 1985; Pickering *et al.*, 1986; Balm and Pottinger, 1995), και η επικρατούσα υπόθεση είναι ότι τα επίπεδα των μελανοτροπικών POMC προϊόντων στο πλάσμα, εξαρτώνται από τη φύση ή/και την ένταση του στρεσογόνου ερεθίσματος. (Balm and Pottinger, 1995; Winberg and Lepage, 1998).

Εκτός από την άμεση σχέση του με το stress, το νευροπεπτίδιο του POMC εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στην ρύθμιση της αναπαραγωγής (Hammer et al., 1994). Η β-ενδορφίνη αλλά και η εγκεφαλίνη δρουν στους μ- και δ- οπιοειδείς υποδοχείς με σημαντικές συνέπειες στον υποθάλαμο (medial preoptic area). Το οπιοειδές κύκλωμα των νευρώνων της περιοχής αυτής, ενεργοποιείται και δρα προς την παύση των γεγονότων του οίστρου αναστέλλοντας τις αναπαραγωγικές ορμόνες και την αντίστοιχη συμπεριφορά. Πιο συγκεκριμένα, υπό την παρουσία αυξημένων επιπέδων οιστραδιόλης και προγεστερόνης στο πλάσμα, παρατηρείται αύξηση των μεταγράφων του POMC στην υπόφυση και ταυτόχρονη αύξηση των οπιοειδών μ-υποδοχέων του υποθαλάμου, με αποτέλεσμα η παραγόμενη β-ενδορφίνη να συνδέεται με τους μ-οπιοειδείς υποδοχείς του υποθαλάμου προς αναστολή της απελευθέρωσης του παράγοντα έκκρισης της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LHRF) και του αναπαραγωγικού κύκλου (Hammer et al., 1994).

Δεδομένης της άμεσης σχέσης του με την απόκριση στο stress μέσω της ACTH και τη ρύθμιση της αναπαραγωγικής διαδικασίας μέσω της β-ενδορφίνης, το POMC μπορεί να αποτελεί ένα πεπτίδιο-κλειδί στις αρνητικές επιπτώσεις του stress στην αναπαραγωγή. Σκοπός της παρούσας εργασίας, ήταν η συσχέτιση των επιπέδων του εγκεφαλικού πεπτιδίου POMC και της P450 αρωματάσης, που θεωρείται ο διακόπτης της φυλετικής διαφοροποίησης, στο λαβράκι *Dicentrarchus labrax* (Piferrer et al., 1994). Το λαβράκι, τελεόστεος της οικογένειας των Moronidae, αποτελεί είδος υψηλού βιολογικού και οικονομικού ενδιαφέροντος σε Μεσόγειο και Ατλαντικό ωκεανό. Όπως σε πολλά ποικιλόθερμα είδη, στο είδος αυτό ο καθορισμός του φύλου δεν είναι χρωμοσωμικός αλλά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από περιβαλλοντικούς και φυσιολογικούς παράγοντες. Η μελέτη της φυλετικής διαφοροποίησης και συγκεκριμένα της θηληκοποίησης αποκτά αυξημένο ενδιαφέρον στο συγκεκριμένο είδος γιατί κάτω από συνθήκες καλλιέργειας, το φυλετικό ισοζύγιο διαφοροποιείται υπέρ των αρσενικών ατόμων που όμως αναπτύσσονται με πολύ χαμηλούς ρυθμούς σε σχέση με τα θηλυκά (Carillo et al., 1995). Το γεγονός αυτό επιφέρει σημαντικές οικονομικές απώλειες στην εκτροφή του λαβρακιού, η οποία στην εντατική της μορφή περιλαμβάνει σειρά στρεσογόνων παραγόντων (π.χ. αυξημένη ιχθυοπυκνότητα, χειρισμοί) που θα μπορούσαν να έχουν άμεση επίδραση στο φυλετικό ισοζύγιο.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πείραμα διεξήχθη σε εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και διήρκεσε οκτώ ημέρες μετά το πέρας της απαιτούμενης για τον εγκλιματισμό των πειραματόζων χρονικής περιόδου.

Πειραματόζωα και ενυδρεία

Λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) μεταφέρθηκαν από τοπική μονάδα εντατικής εκτροφής στις εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου και εγκλιματίστηκαν σε εργαστηριακές συνθήκες για χρονική περίοδο ενός περίπου μήνα. Στο διάστημα προσαρμογής προσφερόταν τροφή δύο φορές ημερησίως υπό μορφή σύμπηκτων (pellets) Ecostart 15 No 0,4 (Biomar). Τα επίπεδα της διατροφής τους διατηρήθηκαν στο 2,5% του σωματικού τους βάρους ημερησίως.

Με την έναρξη του πειράματος τα λαβράκια χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες (13 άτομα σε κάθε ομάδα) που αντιστοιχούσαν στους τρεις διαφορετικούς χειρισμούς και μεταφέρθηκαν σε τρία διαφορετικά ενυδρεία. Στην πρώτη ομάδα (μέσο βάρος 97.9g), που αποτέλεσε το μάρτυρα χορηγήθηκαν ενδοπεριτονιακά 10μL λάδι καρύδας/g σωματικού βάρους. Στην δεύτερη ομάδα (μέσο βάρος 97.2g) χορηγήθηκε ενδοπεριτονιακά κορτιζόλη διαλυμένη σε λάδι καρύδας 50mg/Kg σωματικού βάρους. Στην τρίτη ομάδα (μέσο βάρος 98.6g) χορηγήθηκε ενδοπεριτονιακά metyrapone (2-methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanone) διαλυμένο σε λάδι καρύδας 100mg/Kg σωματικού βάρους, ουσία που αναστέλλει το ένζυμο 11-β-υδροξυλάση σταματώντας τη σύνθεση κορτιζόλης από την 11-δεοξυκορτιζόλη.

Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος τα ψάρια ήταν εκτεθειμένα σε φυσική φωτοπερίοδο, ενώ η μέση θερμοκρασία του νερού ήταν 22°C.

Χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα ενυδρεία, ορθογώνιου σχήματος (0,9m x 0,38m x 0,43m), χωρητικότητας 150L το καθένα. Το σύστημα κυκλοφορίας του νερού ήταν κλειστό, ενώ το κάθε ενυδρείο διέθετε παροχή συμπιεσμένου αέρα, καθώς και αυτόνομο, μηχανικό και βιολογικό φιλτράρισμα. Καθημερινά γινόταν καθαρισμός των ενυδρείων, απομάκρυνση των περιττωμάτων και των υπολειμμάτων τροφής, ενώ μια φορά την εβδομάδα γινόταν τόσο συντήρηση των φίλτρων όσο και αλλαγή του νερού. Επίσης, πραγματοποιούνταν καθημερινές μετρήσεις θερμοκρασίας, οξυγόνου, αλατότητας και αμμωνίας. Η θερμοκρασία μετρούνταν με απλό θερμόμετρο, τοποθετημένο εντός της δεξαμενής. Το οξυγόνο μετρούνταν με οξυγονόμετρο τύπου

WTW oxi320, η αμμωνία με το Kit Tetra Analyset Pro και η αλατότητα με αλατόμετρο τύπου TDS Meter4076.

Δειγματοληψίες

Στη διάρκεια του πειράματος, πραγματοποιήθηκαν πέντε δειγματοληψίες. Την πρώτη ημέρα πριν την χορήγηση των ουσιών, λήφθηκαν δείγματα τριών ατόμων από κάθε ομάδα (ημέρα 0). Τα ψάρια αναισθητοποιούνταν και αφού μετρούνταν το σωματικό τους βάρος (Πίνακας 1), θανατώνονταν, αφαιρούνταν οι γονάδες και ο εγκέφαλος και εμβαπτιζόταν σε 0,5ml ψυχρού TRI Reagent (Sigma Co, USA) πριν αποθηκευτούν στους -20° C. Οι δειγματοληψίες συνεχίστηκαν με τον ίδιο τρόπο στις ημέρες 1, 2, 4 και 8 μετά τη χορήγηση των ουσιών.

Πίνακας 1. Σωματικό βάρος (g) των ατόμων κάθε ομάδας ανά ημέρα δειγματοληψίας

Ημέρα	Μάρτυρας		Κορτιζόλη		Metyrapone	
	Φύλο	Βάρος(g)	Φύλο	Βάρος(g)	Φύλο	Βάρος(g)
0	M	77,00	M	67,80	M	61,00
	M	87,68	M	70,36	F	117,50
1	M	127,41	M	58,28	M	77,93
	F	121,74	M	63,88	F	183,50
2	M	128,54	M	89,13	M	76,47
	M	75,40	F	121,02	M	73,83
	F	96,03	M	90,42	M	155,02
4	M	99,83	M	165,87	F	116,61
	M	145,47	F	118,51	M	139,30
	M	71,70	M	37,24	M	123,45
8	M	73,67	M	116,39	F	62,26
	M	60,78	M	117,04	M	61,31
	M	107,53	M	145,31	M	34,35
Μέσο βάρος		97,91± 26,52	97,20±37, 34		98,65±43, 90	

Απομόνωση RNA

Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν μηχανικά (ομογενοποιητής ULTRA TURAX, IKA-WERKE), προστέθηκε 0,5 ml ψυχρού TRI Reagent, και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 12000 x g για 10min στους 4° C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες eppendorf, στο οποίο προστέθηκε 0,2ml χλωροφορμίου ανά ml αρχικού TRI Reagent που χρησιμοποιήθηκε. Στη συνέχεια

ανακινήθηκαν καλά και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 2-15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 12000 x g για 10min στους 4°C.

Η υδατική φάση απομονώθηκε και μεταφέρθηκε σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες eppendorf όπου προστέθηκε 0,5ml ισοπροπανόλης ανά ml αρχικού TRI Reagent που χρησιμοποιήθηκε. Στη συνέχεια, αφού τα δείγματα ανακινήθηκαν και επωάστηκαν για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρήθηκαν στις 12000 x g για 10min στους 4°C. Το ίζημα RNA που απομονώθηκε πλύθηκε με την προσθήκη 1ml αιθανόλης 75% ανά ml αρχικού TRI Reagent που χρησιμοποιήθηκε, και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Σύνθεση cDNA

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12000 x g για 15min στους 4°C. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε και τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν μέσα σε πάγο. Ακολούθησε επαναδιαλυτοποίηση των δειγμάτων σε νερό που είχε προστεθεί DEPC (Diethyl Pyrocarbonate –Research Organics). Κατόπιν τα δείγματα φωτομετρήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA σε κάθε δείγμα. Από αυτά δημιουργήθηκαν διαλύματα RNA 5μg με DEPC. Τα δείγματα των ατόμων του ίδιου φύλου, ομάδας και της ίδιας ημέρας δειγματοληψίας συνενώθηκαν και αποτέλεσαν ένα κοινό δείγμα.

Συμπληρωματικό DNA (cDNA) συντέθηκε στους 37°C για 2 hr από 5μg ολικού RNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription). Ως εκκινητής της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε oligo dT₍₁₈₎ (Sigma Co, USA), έτσι ώστε να μεταγραφούν όλα τα μόρια του mRNA που περιέχονται στα 5μg ολικού RNA. Το μίγμα της αντίδρασης που προστέθηκε σε κάθε δείγμα περιείχε: 6μl 5x RT buffer, 3μl dNTPs (10mM), 3μl DTT (0,1 M), 0,2μl αναστολέα RNAase (RNAase inhibitor), και 0,2μl αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase, 200U/μl; GIBCO). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 30μl. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Σχεδιασμός εκκινητών

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση γνωστές αλληλουχίες διαθέσιμες μέσω της GenBank. Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: α) *D. labrax* P450 aromatase (Accession number AJ311177) β) *D. labrax* POMC (Accession number AY691808) γ) *D. labrax* β-actin (Accession number AJ537421). Οι εκκινητές για το μόριο του 28SrRNA σχεδιάστηκαν με βάση τμήμα της αλληλουχίας του 28SrRNA που

απομονώθηκε τυχαία από λαβράκι. Οι αλληλουχίες των εκκινητών δίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε μόριο

Εκκινητές της P450 αρωματάσης (Γοναδική μορφή)		
Forward	5' GCCAGCAACTACTACAACAACAA 3'	T _m :51,6°C
Reverse	5' CCTGAACCGAATGGCTGGAA 3'	T _m :52,4°C
Εκκινητές της POMC		
Forward	5' ATGGARCAYT TYMGITGGGG 3'	T _m :51,2°C
Reverse	5' CATRAAICCCICRTAICKYTT 3'	T _m :42,2°C
Εκκινητές της β-ακτινης		
Forward	5' GAGGAGCACCCNGTCSTG 3'	T _m :47,1°C
Reverse	5' GGTGGTWCCWCCRGACARYAC 3'	T _m :50,0°C
Εκκινητές του 28SRNA		
Forward	5' TCAAACGGTAACGCAGGTG 3'	T _m :51,9°C
Reverse	5' CGCTATGAACGCTTGGC 3'	T _m :49,9°C

Ενίσχυση και ταυτοποίηση προϊόντων

Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις PCR και τα προϊόντα που προέκυψαν κλωνοποιήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχηση.

A. P450 αρωματάση

Συμπληρωματικό DNA (5μl) από ωοθήκη λαβρακιού ενισχύθηκε σε PCR αντίδραση συνολικού όγκου 50μl που περιείχε 5μl PCR buffer 10x, 7 μl MgCl₂ (25mM), 1 μl dNTPs (10mM), από 1 μl για κάθε εκκινητή, και 0,2 μl Taq polymerase (5mM). Η αντίδραση ενίσχυσης περιελάμβανε 1min στους 94°C και 36 επαναλήψεις με 30sec στους 94°C, 1,5min στους 54°C και 1,5min στους 72°C.

B. POMC

Συμπληρωματικό DNA (5μl) από εγκέφαλο λαβρακιού ενισχύθηκε σε PCR αντίδραση συνολικού όγκου 50μl που περιείχε 5μl PCR buffer 10x, 7 μl MgCl₂ (25mM), 1 μl dNTPs (10mM), από 0,5 μl για κάθε POMC εκκινητή, και 0,2 μl Taq polymerase (5mM). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: 95°C για 9min και 40 επαναλήψεις με 95°C για 30sec, 46°C για 1min και 60°C για 1min.

Γ. β-Ακτίνη

Συμπληρωματικό DNA (5μl) από εγκέφαλο λαβρακιού ενισχύθηκε σε PCR αντίδραση συνολικού όγκου 50μl που περιείχε 5μl PCR buffer 10x, 3 μl MgCl₂

(25mM), 1 μ l dNTPs (10mM), από 1 μ l για κάθε BA εκκινητή, και 0,2 μ l Taq polymerase (5mM). Η αντίδραση ενίσχυσης περιελάμβανε 3min στους 94°C και 30 επαναλήψεις με 45sec στους 94°C, 1min στους 48°C και 1min στους 72°C.

Δ. 28SrRNA

Συμπληρωματικό DNA (5 μ l) από εγκέφαλο λαβρακιού ενισχύθηκε σε PCR αντίδραση συνολικού όγκου 50 μ l που περιείχε 5 μ l PCR buffer 10x, 4 μ l MgCl₂ (25mM), 1 μ l dNTPs (10mM), από 1 μ l για κάθε 28SRNA εκκινητή, και 0,2 μ l Taq polymerase (5mM). Η αντίδραση ενίσχυσης περιελάμβανε 1min στους 94°C και 33 επαναλήψεις με 30sec στους 94°C, 1min στους 52°C και 45sec στους 72°C.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων καθαρίστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham Biosciences, UK) και κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο pGEM-T Easy της Promega, σε βακτηριακή σειρά *E.coli* XL1B ως εξής:

- ✓ Αρχικά, εμβολιάστηκαν βακτήρια σε LB Broth, τα οποία προέρχονταν από τριβλία με άγαρ και τετρακυκλίνη.
- ✓ Στη συνέχεια επώαστηκαν στους 37°C για μια νύχτα, ενώ παράλληλα ετοιμάστηκαν νέα τριβλία με: 20ml άγαρ, 0,5mM IPTG (Isopropyl b-D-thiogalactopyraniside; Promega, USA), 80 μ g/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3 indolyl B-D-Galacto-pyranoside; tablets, Promega) και 100 μ g/ml από το αντιβιοτικό αμπικιλίνη.
- ✓ Νέος εμβολιασμός βακτηρίων σε 5ml LB Broth και επώαση στους 37°C για 2 ώρες
- ✓ Φυγοκέντριση στους 4°C, 3000 rpm για 5min
- ✓ Απομάκρυνση υπερκείμενου και προσθήκη ψυχρού CaCl₂ 0,1M μισού όγκου από την αρχική καλλιέργεια
- ✓ Επώαση για 45min σε πάγο και επαναφυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες
- ✓ Απομάκρυνση υπερκείμενου και προσθήκη ψυχρού CaCl₂ 0,1M 25% του όγκου της αρχικής καλλιέργειας
- ✓ Επώαση για 45min σε πάγο
- ✓ Προσθήκη 200 μ l βακτηρίων στα δείγματα των κλωνοποιημένων PCR προϊόντων και επώαση σε πάγο για 35min
- ✓ Θέρμανση στους 42° C και μετά σε πάγο για 2 min
- ✓ Προσθήκη LB Broth και επώαση στους 37°C με ταυτόχρονη ανάδευση

- ✓ Επιστροφή των καλλιιεργειών σε τριβλία LB-IPTG-Xgal-Αμικικλίνης και επώαση στους 37°C για μια νύχτα.

Η απομόνωση των πλασμιδίων από τις μετασηματισμένες βακτηριακές αποικίες έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Fast PlasmidTM Mini (Eppendorf, Germany).

Η ταυτοποίηση των minipreps έγινε τη μέθοδο της PCR και με τις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω για κάθε μόριο, και τα θετικά πλασμίδια στάλθηκαν για αλληλούχιση. Οι αλληλουχίες παρατίθενται στο Παράρτημα.

HMI-ΠΟΣΟΤΙΚΗ, RT-PCR

A. Σταντάρισμα της μεθόδου

Η RT-PCR αντίδραση είναι μία αρκετά ευαίσθητη μέθοδος μέσω της οποίας μπορούν να ανιχνευθούν μικρά ποσά RNA χάρη στην αντίστροφη μεταγραφή. Παρόλα αυτά, η ακριβής ποσοτικοποίηση δεν είναι πάντα εφικτή με την απλή PCR, μιας και το ποσό του ενισχυμένου προϊόντος δεν αντανακλά απαραίτητα την ποσότητα του μορίου που υπάρχει αρχικά στην αντίδραση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην «φάση πλατό» της PCR η οποία προκαλείται από :

- Απενεργοποίηση της Taq πολυμεράσης.
- Έλλειψη του νουκλεοτιδικού υποστρώματος.
- Έλλειψη εκκινήτων.
- Αναστολή του πυροφωσφορικού άλατος.
- Επανασυγκόλληση εκκινήτων σε ήδη ενισχυμένα cDNA.

Στη διάρκεια αυτής της φάσης, αποκτάται περίπου η ίδια ποσότητα ενισχυμένων προϊόντων, μετά το πέρας αρκετών PCR επαναλήψεων. Για να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο, απαιτείται η εύρεση του κατάλληλου πρωτοκόλλου PCR για το κάθε μόριο ξεχωριστά, ούτως ώστε να αποκτάται επαρκής ποσότητα προϊόντος κατά την εκθετική φάση.

Για όλα τα μόρια πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές αντιδράσεων σε τέσσερις επαναλήψεις η καθεμιά. Στην πρώτη σειρά σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε 1μl cDNA και στη δεύτερη 2μl cDNA.

Μετά το πέρας των 15 κύκλων και για κάθε 3 κύκλους αφαιρούνταν 5μl από το μίγμα της αντίδρασης. Σε κάθε νέο δείγμα προσθέτονταν 3μl loading buffer και διατηρούνταν στους 4°C μέχρι το τέλος της αντίδρασης.

Όταν ολοκληρώνονταν και η τελευταία δειγματοληψία, τα δείγματα ηλεκτροφορούνταν σε πηκτή αγαρόζης 2%. Τα ηλεκτροφορήματα φωτογραφίζονταν και αποθηκεύονταν ηλεκτρονικά. Στη συνέχεια με βάση τη μεθοδολογία της πυκνομετρίας η εικόνα αναλύονταν και τελικά καθορίζονταν ο επιθυμητός αριθμός των κύκλων για κάθε μόριο.

B. Η ημι-ποσοτική RT-PCR

Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία, για την ακριβή μέτρηση των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων στα κύτταρα, τα επίπεδα cDNA που εφαρμόζονται κανονικοποιούνται σε ένα πάγιο ποσό. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας την ίδια τεχνική RT-PCR και ενισχύοντας ένα εσωτερικό μόριο αναφοράς (internal standard). Η β-ακτίνη και το 28SRNA είναι δύο μόρια τα οποία μπορούν εύκολα να παίξουν αυτό το ρόλο μιας και εκφράζονται σε όλα τα είδη κυττάρων και σε μεγάλη ποσότητα. Εφ' όσον το γονίδιο στόχος και το γονίδιο αναφοράς ενισχύονται μέσω της RT-PCR, στη συνέχεια τοποθετούνται στην ίδια θέση στην πηκτή ηλεκτροφόρησης. Από κάθε ηλεκτροφόρηση και με τη μέθοδο της πυκνομετρίας, υπολογίστηκε ο λόγος του σήματος μεταξύ του εκφραζόμενου γονιδίου-στόχου και του εκφραζόμενου γονιδίου αναφοράς.

Αποτελέσματα

A. Προσδιορισμός παραμέτρων ημι-ποσοτικής PCR

Ο αρχικός σκοπός μας ήταν η εύρεση του κατάλληλου πρωτοκόλλου PCR για το κάθε μόριο ξεχωριστά, ούτως ώστε να αποκτάται ικανοποιητική ποσότητα προϊόντος κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης.

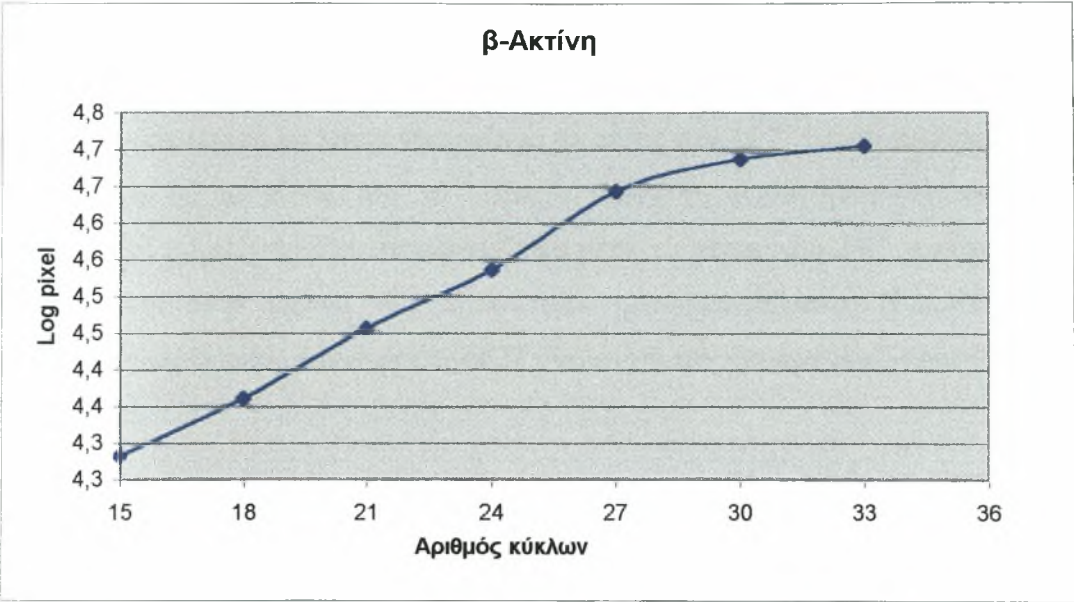
Κατά συνέπεια, πραγματοποιήθηκαν PCR αντιδράσεις για το κάθε μόριο ξεχωριστά οι οποίες διακόπτονταν κάθε τρεις κύκλους για τη λήψη δείγματος. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης, φωτογραφήθηκαν και στη συνέχεια, με τη βοήθεια του κατάλληλου λογισμικού (Densitometry software: ImageQuant TL, Amersham) προσδιορίστηκε ο αριθμός των pixel που αντιστοιχούσε στη ζώνη του PCR προϊόντος, ενώ τα τελικά αποτελέσματα λογαριθμήθηκαν και συσχετίστηκαν με των αριθμό των αντίστοιχων κύκλων.

1. β-Ακτίνη

Για την εύρεση του κατάλληλου αριθμού κύκλων της PCR για το μόριο της β-ακτίνης έγιναν επτά συνολικά δειγματοληψίες μεταξύ του 15^{ου} και του 33^{ου} κύκλου της αντίδρασης (Εικ.1). Βάση της καμπύλης που κατασκευάστηκε επιλέχθηκε η αντίδραση να εξελίσσεται για 24 κύκλους, σημείο που αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση της αντίδρασης και εξασφαλίζει ικανοποιητική συσσώρευση προϊόντος.

2. 28SrRNA

Για την εύρεση του κατάλληλου αριθμού κύκλων της PCR για το μόριο του 28SrRNA έγιναν επίσης επτά δειγματοληψίες, μεταξύ του 15^{ου} και του 33^{ου} κύκλου της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 2. Βάση της καμπύλης επιλέχθηκαν πάλι οι 24 κύκλοι για την εφαρμογή του ημι-ποσοτικού προσδιορισμού.

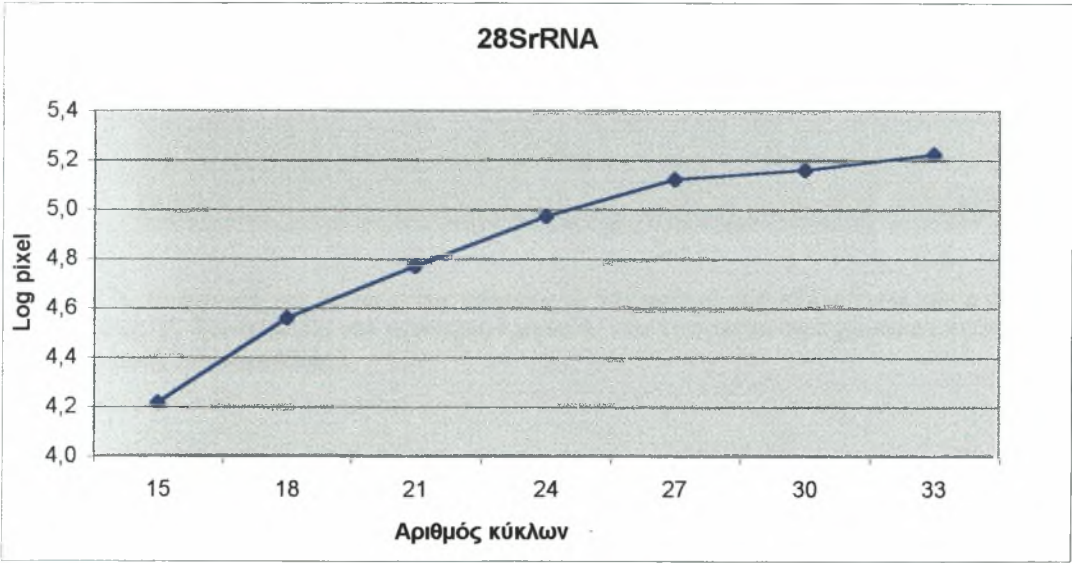


A.



B.

Εικόνα 1. Α. Συσχέτιση της έντασης του σήματος με τον αριθμό των κύκλων για το μόριο της β-ακτίνης. Β. Φωτογραφία του ηλεκτροφορήματος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης.



A.

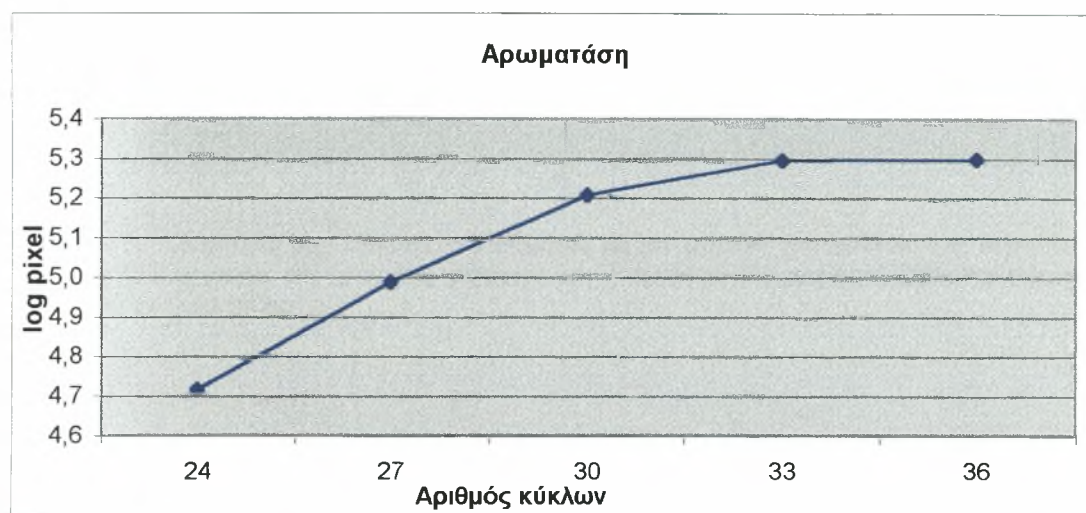


B.

Εικόνα 2. Α. Συσχέτιση της έντασης του σήματος με τον αριθμό των κύκλων στο μόριο του 28SrRNA. Β. Φωτογραφία του ηλεκτροφορήματος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης.

3. P450 αρωματάση (γοναδική μορφή)

Στην περίπτωση της P450 αρωματάσης έγιναν οκτώ συνολικά δειγματοληψίες με την πρώτη δειγματοληψία να λαμβάνει χώρα με το πέρας του 15^{ου} κύκλου αντίδρασης και η τελευταία με το πέρας του 36^{ου} (Εικ.3). Αυτή τη φορά όμως ποσότητα του ενισχυμένου μορίου αρχίζει να εμφανίζεται μετά το πέρας του 24^{ου} κύκλου, όπως φαίνεται και στην εικόνα του αντίστοιχου ηλεκτροφορήματος (Εικ.3B). Στην προκειμένη περίπτωση, επιλέχθηκαν οι 27 κύκλοι για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό του μορίου.



A.

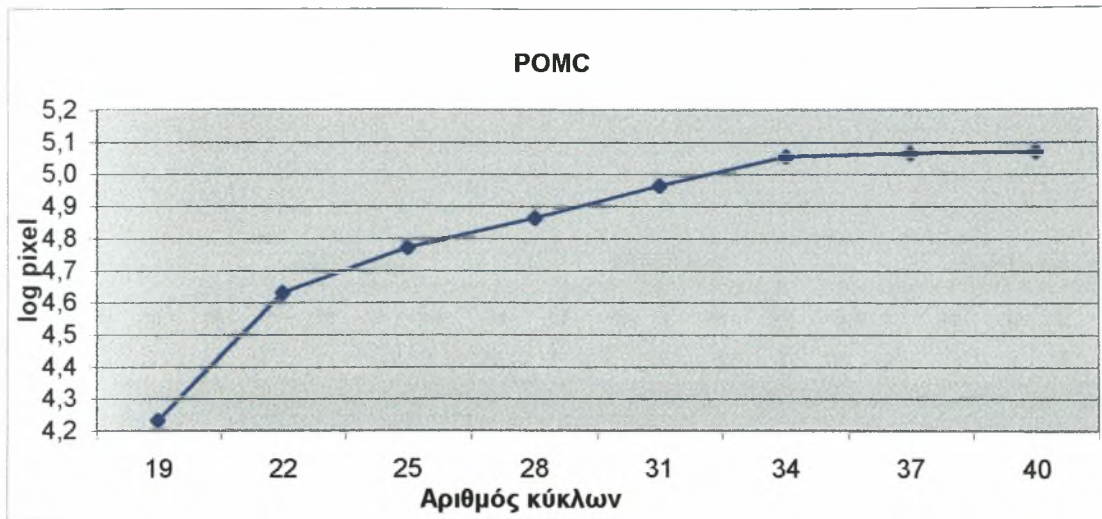


B.

Εικόνα 3. Α. Συσχέτιση της έντασης του σήματος με τον αριθμό των κύκλων στο μόριο της P450 αρωματάσης. Β. Φωτογραφία του ηλεκτροφορήματος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης.

4. POMC

Για το μόριο του POMC έγιναν οκτώ δειγματοληψίες, μεταξύ του 19^{ου} και του 40^{ου} κύκλου της αντίδρασης (Εικ.4). Βάση της καμπύλης που κατασκευάστηκε επιλέχθηκε η αντίδραση να εξελίσσεται για 28 κύκλους, σημείο που επίσης αντιστοιχεί στη λογαριθμική φάση της αντίδρασης και εξασφαλίζει ικανοποιητική συσσώρευση προϊόντος.



A.



B.

Εικόνα 4. Α. Συσχέτιση της έντασης του σήματος με τον αριθμό των κύκλων στο μόριο του POMC Β. Φωτογραφία του ηλεκτροφορήματος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης.

B. Τα μόρια αναφοράς: β-ακτίνη και 28SrRNA

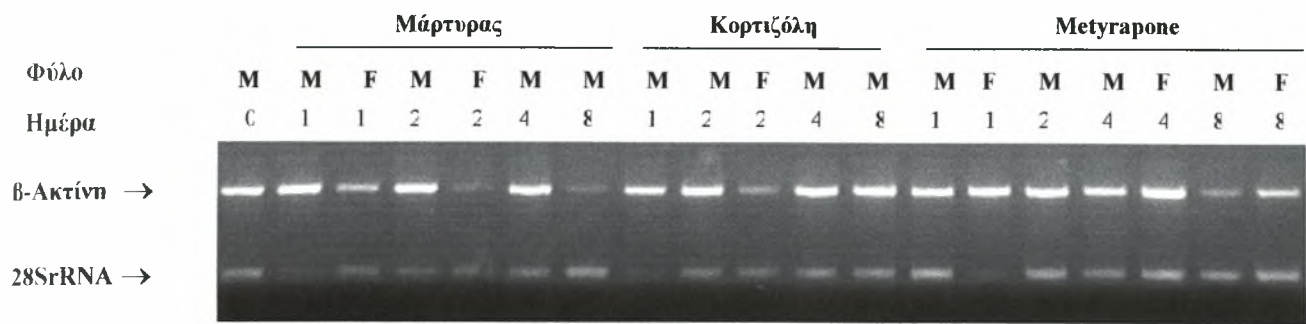
Στη μέθοδο της ημι-ποσοτικής RT-PCR, ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-στόχων, απαιτεί πρώτα την κανονικοποίηση των επιπέδων cDNA που χρησιμοποιούνται, σε σχέση με ένα μόριο αναφοράς.

Στην προκειμένη περίπτωση, υπήρξε η δυνατότητα ελέγχου δύο μορίων αναφοράς, της β-ακτίνης και του 28SrRNA. Και τα δύο μόρια εκφράζονται, σε όλα τα είδη κυττάρων και σε μεγάλη ποσότητα. Ακολουθώντας τα επιλεγόμενα πρωτόκολλα PCR αντίδρασης κάθε φορά, υπολογίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης και του 28SrRNA στα δείγματα του εγκεφάλου και των γονάδων (Εικ.5 και 6).

1. Εγκέφαλος

Σε δείγματα εγκεφάλου λαβρακιού, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της β-ακτίνης και του 28SrRNA (Εικ.5). Στη συνέχεια, μετρήθηκε η ένταση του εκάστοτε σήματος, οι τιμές λογαριθμήθηκαν και τέλος υπολογίστηκαν οι λόγοι έκφρασης των δύο γονιδίων μεταξύ τους (Πίνακας 1). Όπως ήταν αναμενόμενο, το

γονίδιο της β-ακτίνης, της δομικής πρωτεΐνης του κυτταροσκελετού, εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα απ’ ότι το 28SrRNA μέσα στο κύτταρο.



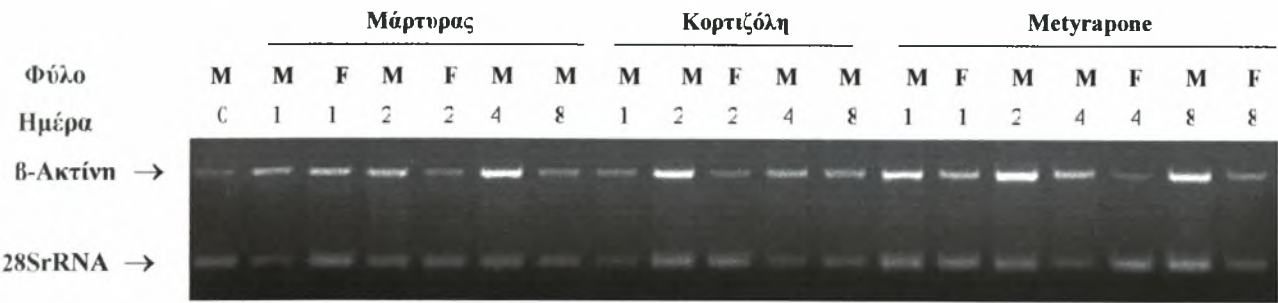
Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων εγκεφάλου. Εμφανίζονται δύο ξεχωριστές σειρές εκφραζόμενων γονιδίων, με την πάνω σειρά να αντιστοιχεί στο γονίδιο της β-ακτίνης και την κάτω σειρά στο γονίδιο του 28SrRNA.

Πίνακας 1: Τιμές των επιπέδων έκφρασης (log pixel) του εκάστοτε γονιδίου ανά δείγμα και οι λόγοι έκφρασης των δύο γονιδίων στα δείγματα του εγκεφάλου

Ομάδα	Ημέρα	Φύλο	β-Ακτίνη	28SrRNA	28SrRNA/β-Ακτίνη
Μάρτυρας	0	M	4,52	3,93	0,86
	1	M	4,67	3,59	0,77
	1	F	4,46	3,81	0,86
	2	M	4,65	3,74	0,80
	2	F	4,27	3,76	0,88
	4	M	4,65	4,04	0,87
	8	M	4,30	4,22	0,98
Κορτιζόλη	1	M	4,59	3,60	0,78
	2	M	4,67	4,06	0,87
	2	F	4,41	4,02	0,91
	4	M	4,68	4,18	0,89
	8	M	4,71	4,26	0,91
Metyrapone	1	M	4,67	4,35	0,93
	1	F	4,69	3,88	0,83
	2	M	4,70	4,33	0,92
	4	M	4,64	4,18	0,90
	4	F	4,73	4,31	0,91
	8	M	4,37	4,14	0,95
	8	F	4,48	4,26	0,95

2. Γονάδες

Τα επίπεδα έκφρασης του 28SrRNA και της β-ακτίνης μελετήθηκαν και στα δείγματα του δεύτερου ιστού, τις γονάδες. Παρόμοια διαδικασία με αυτή του εγκεφάλου ακολουθείται και σε αυτή την περίπτωση (Εικ.6, Πίνακας 2).



Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρημα των δειγμάτων των γονάδων. Και σε αυτή την περίπτωση, εμφανίζονται δύο ξεχωριστές σειρές εκφραζόμενων γονιδίων, με την πάνω σειρά να αντιστοιχεί και πάλι στο γονίδιο της β-ακτίνης και την κάτω σειρά στο γονίδιο του 28SrRNA.

Πίνακας 2: Τιμές των επιπέδων έκφρασης (log pixel) του εκάστοτε γονιδίου ανά δείγμα και οι λόγοι έκφρασης των δύο γονιδίων στα δείγματα των γονάδων

Ομάδα	Ημέρα	Φύλο	β-Ακτίνη	28SrRNA	28SrRNA/ β-Ακτίνη
Μάρτυρας	0	M	4,23	3,99	0,94
	1	M	4,62	3,99	0,86
	1	F	4,69	4,37	0,93
	2	M	4,74	4,27	0,90
	2	F	4,58	4,34	0,94
	4	M	4,83	4,39	0,91
	8	M	4,66	4,29	0,92
Κορτιζόλη	1	M	4,67	4,21	0,90
	2	M	4,85	4,52	0,93
	2	F	4,69	4,52	0,96
	4	M	4,78	4,27	0,89
	8	M	4,77	4,34	0,90
Metyrapone	1	M	4,92	4,54	0,92
	1	F	4,84	4,57	0,94
	2	M	4,92	4,55	0,92
	4	M	4,82	4,28	0,89
	4	F	4,61	4,52	0,98
	8	M	4,85	4,64	0,96
	8	F	4,64	4,21	0,91

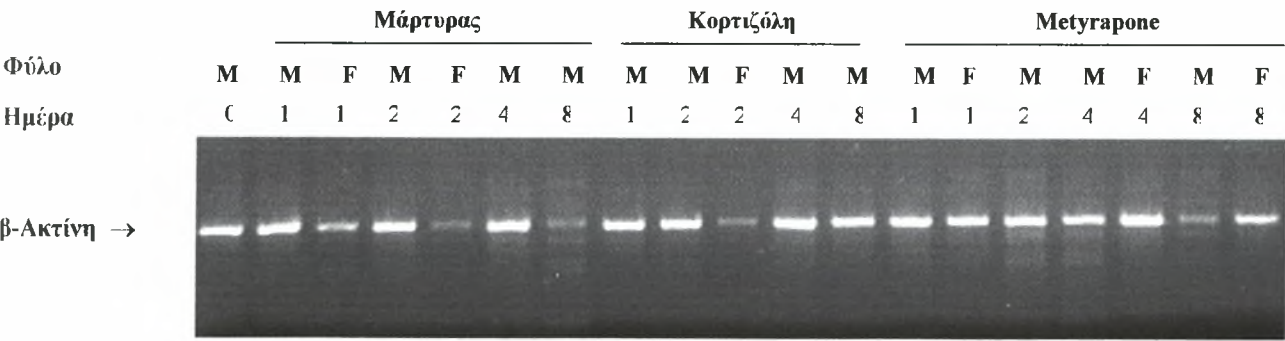
Η αναλογία έκφρασης της β-ακτίνης και του 28SrRNA δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές ούτε μεταξύ του εγκεφάλου (F= 1,53 P= 0,5) και των γονάδων (F= 0,84 P= 0,45), ούτε μεταξύ των ομάδων μεταχειρίσεων (F= 6,11 P= 0,012),

γεγονός που υποδεικνύει ότι η έκφραση τους ήταν ανεξάρτητη από τις παραμέτρους του πειράματος. Έτσι, κρίθηκε ότι μπορούν να αποτελέσουν αξιόπιστα μόρια αναφοράς για την εφαρμογή του ημι-ποσοτικού προσδιορισμού. Κάθε μόριο υπό μελέτη ελέγχθηκε σε σχέση και με τα δύο μόρια αναφοράς και τα τελικά αποτελέσματα σχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης του 28SrRNA.

Γ. Επίδραση στην έκφραση της P450 αρωματάσης και του POMC

1. P450 αρωματάση

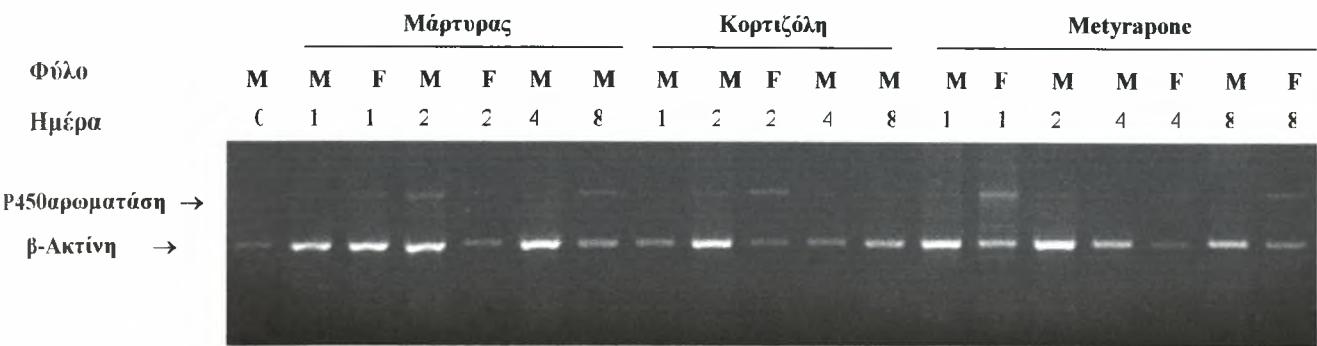
Η P450 αρωματάση είναι το ένζυμο κλειδί στη διαδικασία της αρωματοποίησης των ανδρογόνων προς οιστρογόνα, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως. Εμφανίζει δύο ισομορφές, μία εγκεφαλική και μία γοναδική σε αρκετά είδη οργανισμών. Το λαβράκι είναι ένα από αυτά τα είδη (Dalla Valle *et al.*, 2001; Blázquez and Piferrer, 2004). Στη συγκεκριμένη περίπτωση εξετάστηκε η έκφραση της γοναδικής μορφής της P450 αρωματάσης στον εγκεφαλικό ιστό αρχικά (Εικ.7) και κατόπιν στα γοναδικά κύτταρα (Εικ.8).



Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρημα των δειγμάτων εγκεφάλου όπου εμφανίζεται μόνο η σειρά της β-ακτίνης.

Στην πρώτη περίπτωση (εγκέφαλος), διαπιστώνεται μη-μετρήσιμη έκφραση της εν λόγω ισομορφής, αν και διακρίνονται ορισμένες ζώνες σε κάποια από τα δείγματα (Εικ.7). Οι ζώνες αυτές δεν είναι δυνατό να αντιπροσωπεύουν τη γοναδική μορφή της P450 αρωματάσης στην προκειμένη περίπτωση, είναι όμως πιθανό να αντιστοιχούν σε τμήματα της εκφραζόμενης εγκεφαλικής μορφής του γονιδίου. Αν και δεν

υπήρξαν επιθυμητά αποτελέσματα, έγιναν προσπάθειες για τον έλεγχο της έκφρασης και της εγκεφαλικής ισομορφής. Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την εγκεφαλική μορφή βασίστηκαν σε μη ομόλογα τμήματα των δύο αλληλουχιών ούτως ώστε να είναι κάθε φορά δυνατός ο διαχωρισμός τους. Αντίθετα οι εκκινητές που αντιστοιχούν στη γοναδική μορφή σχεδιάστηκαν με βάση σχετικά ομόλογα τμήματα των αλληλουχιών. Επομένως, σ’ αυτή την περίπτωση είναι πιο πιθανή η εμφάνιση τμημάτων της εγκεφαλικής ισομορφής της P450 αρωματάσης , παρά της γοναδικής .



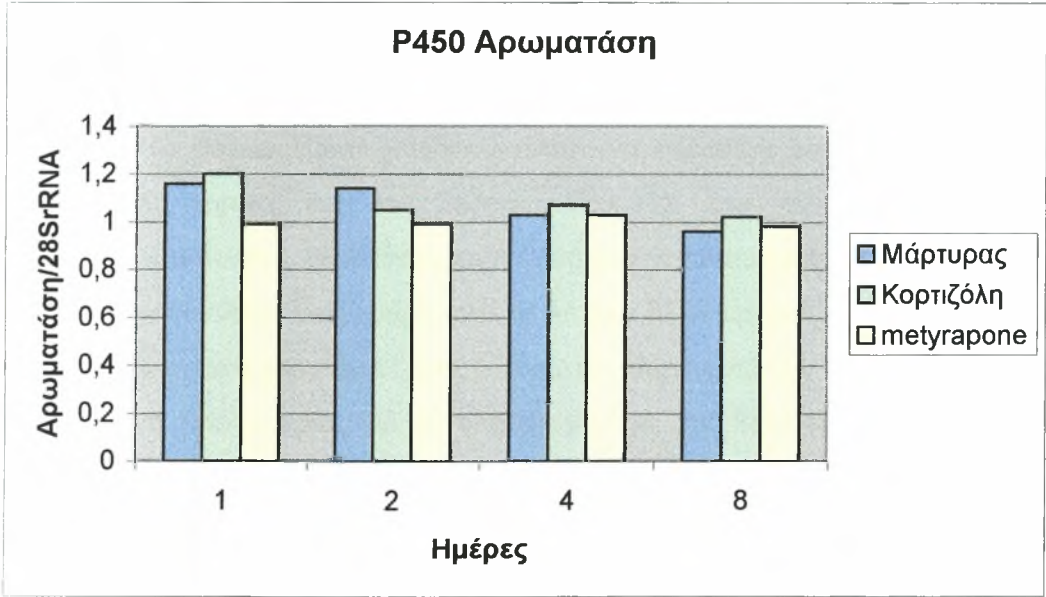
Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρημα των δειγμάτων των γονάδων. Όλα τα δείγματα εκφράζουν το γονίδιο της β-ακτίνης (κάτω σειρά). Δείγματα που αντιστοιχούν στα θηλυκά κυρίως άτομα αλλά και ορισμένα αρσενικά εμφανίζουν και το γονίδιο της P450αρωματάσης.

Στη δεύτερη περίπτωση (γονάδες), η P450 αρωματάση εντοπίζεται, όπως είναι αναμενόμενο, σε όλα τα θηλυκά άτομα αλλά και σε ορισμένα αρσενικά και των τριών ομάδων (Εικ. 8, Πίνακας 3). Από τις τιμές του Πίνακα 3, απομονώσαμε τα αρσενικά άτομα από τα θηλυκά κι αυτό γιατί το συγκεκριμένο πείραμα πραγματεύεται τις επιπτώσεις του στρες στη φυλετική μεταλλαγή των αρσενικών ατόμων προς θηλυκά. Τα θηλυκά άτομα δεν εμφανίζουν ιδιαίτερες αλλαγές στην έκφραση της P450 αρωματάσης και στις τρεις ομάδες καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τα αποτελέσματα των αρσενικών ατόμων παρουσιάζονται στην Εικόνα 9.

Την πρώτη ημέρα μετά τη χορήγηση των ουσιών, τα άτομα στα οποία έχει χορηγηθεί κορτιζόλη, εμφανίζουν ελαφρώς αυξημένα τα επίπεδα έκφρασης της P450 αρωματάσης σε σχέση με το μάρτυρα τα οποία φαίνεται να μειώνονται από τη δεύτερη ημέρα και να παραμένουν σταθερά ως το τέλος της πειραματικής περιόδου. Από την άλλη πλευρά, στα άτομα στα οποία χορηγήθηκε metyrapone, η P450 αρωματάση ακολουθεί ένα σταθερό ρυθμό έκφρασης αν και εμφανίζεται μειωμένη σε σχέση με το μάρτυρα την πρώτη ημέρα. Γενικά, οι τιμές των επιπέδων έκφρασης στα άτομα αυτά δε φαίνεται να μεταβάλλονται καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Πίνακας 3: Τιμές έντασης των επιπέδων έκφρασης (log pixel) του γονιδίου της β-ακτίνης και της P450 αρωματάσης ανά δείγμα και τιμές των λόγων της έκφρασης της P450 αρωματάσης με το 28SrRNA, ανά δείγμα γονάδων

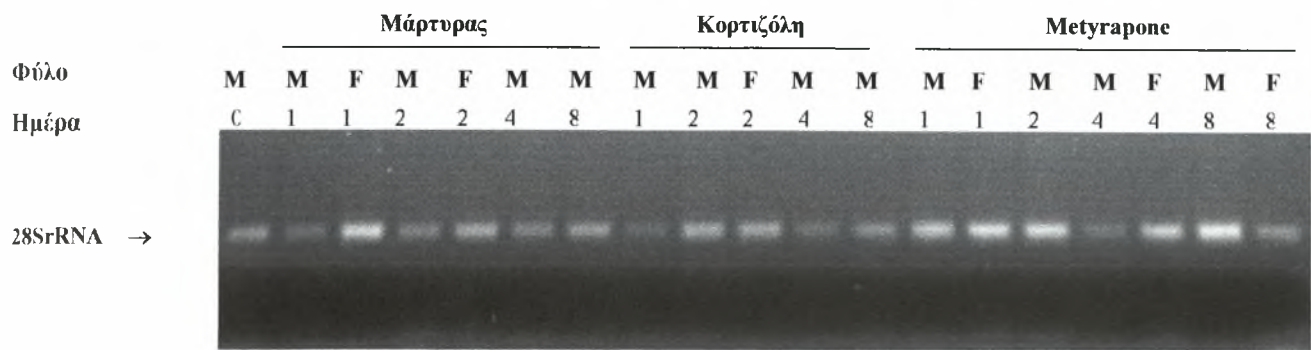
Ομάδα	Ημέρα	Φύλο	ΑΡΩΜΑΤΑΣΗ (P450AROM)	28SrRNA	AROM/ 28SrRNA
Μάρτυρας	0	M	3,85	3,53	1,09
	1	M	4,11	3,55	1,16
	1	F	4,24	4,02	1,06
	2	M	4,30	3,76	1,14
	2	F	4,32	3,71	1,15
	4	M	4,24	4,10	1,03
	8	M	4,23	4,39	0,96
Κορτιζόλη	1	M	4,18	3,46	1,20
	2	M	4,28	4,08	1,05
	2	F	4,47	3,86	1,16
	4	M	4,21	3,94	1,07
	8	M	4,24	4,16	1,02
Metyrapone	1	M	4,37	4,42	0,99
	1	F	4,48	3,86	1,17
	2	M	4,33	4,38	0,99
	4	M	4,22	4,11	1,03
	4	F	4,18	3,94	1,06
	8	M	4,23	4,32	0,98
	8	F	4,08	4,08	1,00



Εικόνα 9. Επίπεδα έκφρασης της P450 αρωματάσης των αρσενικών ατόμων στη διάρκεια της πειραματικής περιόδου.

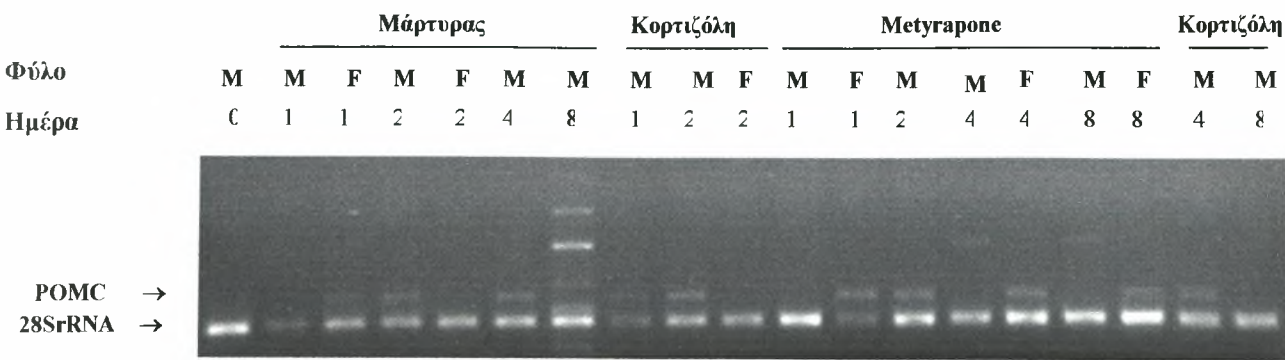
POMC

Το POMC (προ-οπιομελανοκορτίνη) είναι το πρόδρομο μόριο ενός σημαντικού αριθμού ορμονών. Η ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια ενεργοποιεί την παραγωγή και έκκριση του με σκοπό τη ρύθμιση της απόκρισης στο στρες (Wendelaar and Bonga, 1997; Slominski *et al.* 2000). Στην προκειμένη περίπτωση εξετάζεται η έκφραση του POMC γονιδίου στον εγκεφαλικό και γοναδικό ιστό στα άτομα και των τριών ομάδων (Εικ.10-11). Όπως είναι αναμενόμενο, το συγκεκριμένο γονίδιο δεν εκφράζεται στις γονάδες (Εικ.10).



Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρημα των δειγμάτων των γονάδων. Φαίνεται καθαρά μόνο η σειρά του μορίου αναφοράς που εδώ είναι το 28SrRNA.

Αντίθετα, το ίδιο γονίδιο εμφανίζει ενδιαφέροντα αποτελέσματα στην περίπτωση του εγκεφάλου. Το συγκεκριμένο γονίδιο φαίνεται να εμφανίζει περισσότερες από μία εκφραζόμενες μορφές και στο λαβράκι (Εικ.11). Στα περισσότερα δείγματα εμφανίζεται η μοναδική, χαρακτηριστική ζώνη του γονιδίου (μικρή απόσταση ζώνης από αυτή του γονιδίου αναφοράς), ενώ σε κάποια άλλα εμφανίζονται περισσότερες ή/και σε διαφορετική απόσταση ζώνες (δείγματα: ΜάρτυραςM/8, MeM/4, MeM/8). Με εφαρμογή πυκνομετρίας για το ηλεκτροφόρημα της Εικόνας 11 προέκυψαν οι τιμές που δίνονται στον Πίνακα 4.



Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρημα των δειγμάτων εγκεφάλου. Το POMC γονίδιο φαίνεται να εμφανίζει διαφορετικές μορφές, μία εκ’ των οποίων αντιπροσωπεύεται από τα δείγματα εκείνα που εμφανίζουν μια και μόνο επιπλέον ζώνη, ενώ η άλλη από τα δείγματα που παρουσιάζουν περισσότερες της μίας επιπλέον ζώνης.

Πίνακας 4: Τιμές έντασης της έκφρασης (log pixel) των γονιδίων ανά δείγμα και οι τιμές του λόγου έκφρασης του POMC γονιδίου με εκείνο του 28SrRNA, ανά δείγμα γονάδων

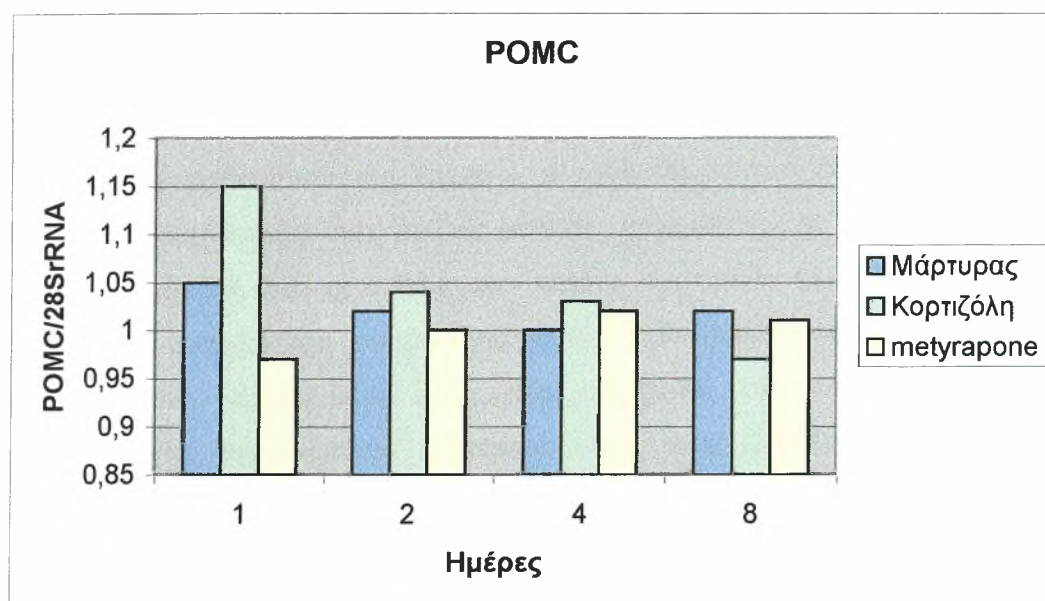
Ομάδα	Ημέρα	Φύλο	POMC	28SrRNA	POMC/ 28SrRNA
Μάρτυρας	0	M	3,19	4,44	0,72
	1	M	3,82	3,64	1,05
	1	F	4,11	4,17	0,99
	2	M	4,21	4,14	1,02
	2	F	4,14	4,21	0,98
	4	M	4,30	4,28	1,00
	8	M	4,54	4,46	1,02
Κορτιζόλη	1	M	4,17	3,63	1,15
	2	M	4,27	4,12	1,04
	2	F	4,17	4,09	1,02
	4	M	4,39	4,26	1,03
	8	M	4,11	4,24	0,97
Metyrapone	1	M	4,29	4,44	0,97
	1	F	4,30	3,56	1,21
	2	M	4,38	4,36	1,00
	4	M	4,31	4,22	1,02
	4	F	4,50	4,41	1,02
	8	M	4,43	4,37	1,01
	8	F	4,51	4,51	1,00

Όπως και στην περίπτωση της P450 αρωματάσης, απομονώθηκαν οι τιμές έκφρασης των αρσενικών και με τον ίδιο τρόπο σχεδιάστηκε το διάγραμμα που απεικονίζει τα

επίπεδα έκφρασης του POMC γονιδίου σε κάθε εξεταζόμενη ομάδα ανά ημέρα δειγματοληψίας (Εικ.12).

Στα αρσενικά άτομα στα οποία είχε χορηγηθεί κορτιζόλη, παρατηρείται μια απότομη αύξηση του εκφραζόμενου POMC γονιδίου από την πρώτη κιόλας ημέρα. Την δεύτερη ημέρα, στην ίδια ομάδα, τα επίπεδα του εγκεφαλικού πεπτιδίου μειώνονται αρκετά και η τιμή αυτή παραμένει στα ίδια επίπεδα και την τέταρτη ημέρα της πειραματικής διαδικασίας. Την όγδοη ημέρα τα επίπεδα του POMC εμφανίζονται χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα του μάρτυρα.

Όσον αφορά την τρίτη ομάδα, στην οποία είχε χορηγηθεί metyrapone, τα επίπεδα του POMC δε φαίνεται να παρουσιάζουν ιδιαίτερες διαφορές σε σχέση με το μάρτυρα, εκτός από την πρώτη ημέρα που εμφανίζονται μειωμένα.



Εικόνα 12. Επίπεδα έκφρασης του POMC των αρσενικών ατόμων σ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει κάποια σχέση στα επίπεδα έκφρασης του POMC και της P450 αρωματάσης υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman (συσχέτιση μεταξύ τάξεων των μεταβλητών) για τα δείγματα όλων των ομάδων ($r_s=0,704$, $P=0,01$). Αν και δε διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση, διαφαίνεται η τάση υψηλά επίπεδα έκφρασης P450 αρωματάσης να συνοδεύονται από αντίστοιχα υψηλά επίπεδα POMC.

Συζήτηση

Τα μόρια αναφοράς: β-ακτίνη και 28SrRNA

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-στόχων στην ημιποσοτική RT-PCR, απαιτείται πρώτα η κανονικοποίηση των επιπέδων cDNA που χρησιμοποιούνται, σε σχέση με ένα μόριο αναφοράς. Γενικά, η επιλογή του μορίου αναφοράς είναι μια δύσκολη διαδικασία που απαιτεί αρκετή προσοχή γιατί θα πρέπει να είναι ένα μόριο που εκφράζεται σε ικανοποιητική ποσότητα μέσα στο κύτταρο και με σταθερά και ανεπηρέαστα από την επεξεργασία ή την κατάσταση των δειγμάτων, επίπεδα έκφρασης.

Στην προκειμένη περίπτωση, υπήρξε η δυνατότητα ελέγχου δύο μορίων, της β-ακτίνης και του 28SrRNA ως μόρια αναφοράς. Και τα δύο γονίδια έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλα αντίστοιχα πειράματα για τον ίδιο σκοπό, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Gelinas *et al.*, 1998; Kishida and Callard, 2001; Dalla Valle *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002; Gornati *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Παρόλα αυτά ελέγχθηκαν οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται για αυτή την επιλογή.

Τα δύο γονίδια εκφράζονται, σε όλα τα είδη κυττάρων και σε μεγάλη ποσότητα. Η β-ακτίνη, ανήκει στην οικογένεια των ινωδών πρωτεϊνών και αποτελεί ένα από τα βασικά συστατικά του κυτταροσκελετού. Το 28SrRNA αποτελεί ένα από τα τρία είδη του ριβοσωμικού RNA που συγκροτεί την μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Όπως ήταν αναμενόμενο, το γονίδιο της β-ακτίνης εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα απ' ό τι το 28SrRNA μέσα στο κύτταρο.

Στο λαβράκι η έκφραση αρκετών μορίων εμφανίζει εποχιακή μεταβολή κάτι όμως που στην προκειμένη περίπτωση δεν αποτελεί αντικείμενο ελέγχου, μιας και η διάρκεια του πειράματος ήταν αρκετά μικρή (οκτώ ημέρες).

Τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων ήταν ανάλογα στους δύο ιστούς υπό εξέταση και δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τη χορήγηση των ουσιών. Έτσι θεωρήθηκαν αξιόπιστα μόρια αναφοράς για την εφαρμογή του ημι-ποσοτικού προσδιορισμού.

P450 αρωματάση

Η P450 αρωματάση είναι το υπεύθυνο ένζυμο για την αρωματοποίηση των ανδρογόνων προς οιστρογόνα και εμφανίζει δύο ισομορφές, μία εγκεφαλική και

μία γοναδική σε αρκετά είδη οργανισμών, όπως το λαβράκι (Dalla Valle *et al.*, 2002; Blázquez and Piferrer, 2004). Στη συγκεκριμένη εργασία ελέγχθηκε η έκφραση της γοναδικής μορφής, η οποία εντοπίστηκε σε όλα τα θηλυκά αλλά και σε ορισμένα αρσενικά άτομα. Το φαινόμενο αυτό πιθανώς να οφείλεται στο μεταβατικό στάδιο της φυλετικής διαφοροποίησης στο οποίο μπορεί να βρίσκονται τα άτομα αυτά. Πιο συγκεκριμένα, το λαβράκι δεν φέρει ετεροχρωμοσώματα πράγμα που κάνει τη φυλετική διάκριση δύσκολη αν όχι αδύνατη σε αρχικά αναπτυξιακά στάδια. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν λήφθηκαν από νεαρά άτομα στα οποία δεν ήταν ακόμη ορατή (ιστολογικά), η διάκριση του φύλου. Επομένως, δεν είναι καθόλου απίθανο ορισμένα άτομα να βρίσκονταν σε μεταβατικό φυλετικό στάδιο προς θηλυκοποίηση, οπότε και είχε αρχίσει η έκφραση της P450 αρωματάσης.

Προ-οπιομελανοκορτίνη (POMC)

Η έκθεση σε ένα στρεσογόνο παράγοντα έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια και κατά συνέπεια την παραγωγή και έκκριση του POMC, με σκοπό τη ρύθμιση της απόκρισης στο stress (Wendelaar and Bonga, 1997). Το συγκεκριμένο γονίδιο εντοπίζεται πολύ νωρίς στην ιστορία της εξέλιξης των χορδωτών και έχει υποστεί μετατροπές συγκεκριμένες για κάθε γενεαλογία σπονδυλωτών (Danielson and Doris, 1999). Σε είδη κατώτερων σπονδυλωτών, όπως στους τελεόστεους, παρατηρείται η έκφραση δύο POMC γονιδίων με διαφορετικό βαθμό ομολογίας ανάλογα με το είδος. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την έκφραση ενός δευτέρου POMC μορίου, που πιθανώς να αποτελεί και το προϊόν ενός δευτέρου γονιδίου.

Φυλετική διαφοροποίηση των τελεόστεων και stress

Το φύλο στους τελεόστεους, όπως το λαβράκι, καθορίζεται από δύο ξεχωριστές διαδικασίες: το φυλετικό καθορισμό και τη φυλετική διαφοροποίηση. Ο φυλετικός καθορισμός είναι υπεύθυνος για το φυλετικό γενότυπο ενώ η φυλετική διαφοροποίηση αφορά την ανάπτυξη συγκεκριμένης μορφής γαμετικών κυττάρων (σπερματοζώαρια ή ωάρια). Συνήθως, ένας αρσενικός γενότυπος επιφέρει τον αντίστοιχο αρσενικό φαινότυπο και ένας θηλυκός γενότυπος, τον αντίστοιχο θηλυκό φαινότυπο. Παρόλα αυτά, η φυλετική διαφοροποίηση, κυρίως σε κατώτερα σπονδυλωτά, μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους

περιβαλλοντικούς παράγοντες και κοινωνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφορετικού φαινοτυπικού φύλου από το αντίστοιχο γενοτυπικό. Το φαινοτυπικό φύλο συχνά σχετίζεται με το είδος των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα από την περίοδο ανάπτυξης των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων μέχρι και την τελική διαφοροποίηση αυτών σε σπέρμα ή ωάρια (Shapiro, 1980; Bruslé and Bruslé, 1983).

Το λαβράκι είναι γονοχωριστικό είδος (Blázquez *et al.*, 1995). Πρόκειται για ένα αρκετά ευαίσθητο ψάρι με υψηλό οικονομικό ενδιαφέρον όπου τα θηλυκά εμφανίζουν μεγαλύτερους ρυθμούς αύξησης από τα αρσενικά (Carrillo *et al.*, 1995; Saillant *et al.*, 2001a) και επομένως μεγάλο ενδιαφέρον στρέφεται στην ανάπτυξη μονοφυλετικών - θηλυκών - καλλιέργειών. Επιπρόσθετα, σε μια προσπάθεια μείωσης του κόστους παραγωγής αναπτύσσονται εντατικές καλλιέργειες υψηλής ιχθυοπυκνότητας. Σε τέτοιου είδους καλλιέργειες, όπου η λήψη τροφής και οι κοινωνικές αλληλεπιδράσεις αποτελούν στρεσογόνες καταστάσεις, η φυλετική αναλογία φαίνεται να διαφοροποιείται υπέρ των αρσενικών ατόμων που όμως αναπτύσσονται με πολύ χαμηλούς ρυθμούς (Carillo *et al.*, 1995). Στην προκειμένη περίπτωση εξετάστηκε η συσχέτιση αυτής της φυλετικής διαφοροποίησης με το stress, μελετώντας τα επίπεδα έκφρασης της P450 αρωματάσης σε σχέση με εκείνα του εγκεφαλικού πεπτιδίου POMC.

Η P450 αρωματάση αποτελεί κύριο ένζυμο στη διαδικασία της φυλετικής διαφοροποίησης και κατά συνέπεια στη δράση των ενδογενών φυλετικών στεροειδών. Κατά τη διάρκεια της φυλετικής διαφοροποίησης, τα φυλετικά στεροειδή ενεργούν περισσότερο ως μορφολογικοί παράγοντες, ενώ κατά την περίοδο της σεξουαλικής ωρίμανσης, ενεργούν κυρίως ως λειτουργικοί παράγοντες (Adkins-Regan, 1981).

Η P450 αρωματάση εμφανίζει δύο ισομορφές, μία εγκεφαλική και μία γοναδική (P450aromB και P450aromA αντίστοιχα). Η γοναδική μορφή εμφανίζεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε θηλυκά άτομα, ενώ η έκφρασή της μειώνεται συνεχώς στο μεταβατικό φυλετικό στάδιο και ελαχιστοποιείται σε αρσενικά άτομα (Zhang *et al.*, 2004). Από την άλλη πλευρά η εγκεφαλική μορφή της, εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στον εγκέφαλο των ψαριών που βρίσκονται σε μεταβατικό στάδιο. Φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη φυλετική διαφοροποίηση του εγκεφάλου σε συνδυασμό με την τοπική παραγωγή των οιστρογόνων κατά τη μετάβαση ενός θηλυκού ατόμου σε αρσενικό (Zhang *et al.*,

2004), ενώ η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων σχετίζεται άμεσα με διαφοροποιήσεις της ενζυμικής δραστηριότητας της αρωματάσης (Pieau *et al.*, 1994).

Στη μία ομάδα ψαριών ενέθηκε κορτιζόλη και στην άλλη metyrapone, που αναστέλλει την *de novo* σύνθεση της κορτιζόλης από την 11-δεοξυκορτιζόλη.

Όπως είναι γνωστό, η έκκριση της κορτιζόλης σε έναν οργανισμό βρίσκεται υπό τον έλεγχο του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια (HPA ή HPI άξονας για τα ψάρια). Η επινεφριδιοφλοιωτρόπος ορμόνη (ACTH) είναι ο κύριος παράγοντας έκλυσης της κορτιζόλης σ' έναν οργανισμό. Όταν ένα άτομο εκτίθεται σε ένα στρεσογόνο παράγοντα, τα επίπεδα της κορτιζόλης αλλά και της ACTH αυξάνονται σε μικρό μάλιστα χρονικό διάστημα. Ακόμα, αυξάνονται και τα επίπεδα του εκφραζόμενου POMC πεπτιδίου στην υπόφυση τα οποία παραμένουν υψηλά για αρκετό χρόνο (Winberg and Lepage, 1998; Škultétzová and Ježová, 1999). Η αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης του πλάσματος προκαλεί μέσω της αρνητικής ανάδρασης, μείωση των επιπέδων της ACTH του πλάσματος στο επίπεδο του υποθαλάμου-υπόφυσης, με σκοπό την «εξοικείωση» του οργανισμού με την κατάσταση την οποία βρίσκεται και με απώτερο σκοπό την αποφυγή επιβλαβών αποτελεσμάτων από την αύξηση των κορτικοστεροειδών (Pickering *et al.*, 1987; Balm *et al.*, 1993; Winberg and Lepage, 1998; Mommsen *et al.*, 1999). Τα επίπεδα έκφρασης του POMC φαίνεται να παραμένουν υψηλά ακόμα κι όταν τα επίπεδα κορτιζόλης, της ACTH και του υποθαλαμικού παράγοντα απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRF) έχουν επιστρέψει σε φυσιολογικά επίπεδα (Winberg and Lepage, 1998; Škultétzová and Ježová, 1999).

Σε αυτήν την εργασία, η χορήγηση κορτιζόλης οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του POMC, ενώ το metyrapone σε μείωση. Η απόκριση του POMC, αν και αναμενόμενη, δεν είχε μεγάλη διάρκεια και η έκφραση επανήλθε πολύ γρήγορα σε επίπεδα ανάλογα με του μάρτυρα, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην άπαξ χορήγηση ουσιών, που δεν προσομοιάζει επιτυχώς τις πραγματικές καταστάσεις stress.

Η αύξηση της έκφρασης του POMC συνοδεύτηκε και από αύξηση στην έκφραση της P450 αρωματάσης και μάλιστα διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση στα επίπεδα έκφρασης των δύο μορίων. Υπεύθυνη για αυτή τη συσχέτιση μπορεί να είναι το παράγωγο του POMC, η β-ενδορφίνη, η οποία εμπλέκεται στον έλεγχο της

αναπαραγωγής αναστέλλοντας την έκλυση των γοναδοτροπινών και των αναπαραγωγικών διαδικασιών (Dixon and Nevison, 1997; Hammer *et al.*, 1994).

Συμπερασματικά:

- Σε καταστάσεις stress, η επακόλουθη αύξηση της κορτιζόλης συνεπάγεται και αύξηση των επιπέδων της προ-οπιομελανοκορτίνης, τα οποία στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία επανέρχονται γρήγορα σε φυσιολογικά επίπεδα.
- Ταυτόχρονα, παρατηρείται μια σχετική αύξηση και των επιπέδων έκφρασης της P450 αρωματάσης, η οποία φαίνεται να ακολουθεί την ίδια πορεία με αυτή του POMC.
- Άτομα με υψηλά επίπεδα έκφρασης προ-οπιομελανοκορτίνης εμφανίζουν και αντίστοιχα υψηλά επίπεδα έκφρασης P450 αρωματάσης.
- Πιθανή αιτία συσχέτισης των δύο μορίων να είναι η παραγωγή και δράση της β-ενδορφίνης, υπόθεση όμως που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση για την πιστοποίησή της.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αλληλουχίες στόχοι

Πριν από την έναρξη της κύριας πειραματικής διαδικασίας ήταν απαραίτητη η εύρεση της ακριβούς νουκλεοτιδικής ακολουθίας των γονιδίων στόχων. Επομένως, στο κάθε προς εξέταση μόριο εντοπίστηκε η αλληλουχία του γονιδιακού τμήματος που περικλείεται από το εκάστοτε ζεύγος εκκινητών και που θα ενισχύεται κάθε φορά στην πορεία του πειράματος.

Όλα τα ζεύγη των εκκινητών εντοπίζονται σε εκφραζόμενα τμήματα των γονιδίων και όχι σε αμετάφραστες περιοχές. Οι εκκινητές οι οποίοι σχεδιάστηκαν για το γονίδιο του 28SrRNA περιβάλουν ένα τμήμα 217 βάσεων εντός του μεταφραζόμενου γονιδιακού τμήματος. Αντίστοιχα, της P450αρωματάσης ένα τμήμα 1062 βάσεων, του εγκεφαλικού πεπτιδίου POMC, ένα τμήμα 231 βάσεων και τέλος της β-ακτίνης ένα τμήμα 615 βάσεων. Οι αλληλουχίες παρουσιάζονται ξεχωριστά παρακάτω (οι εκκινητές αποδίδονται κάθε φορά ως έντονες και υπογραμμισμένες ακολουθίες).

28SrRNA

GCTCAAACGGTAACGCAGGTGTCCTAAGGCGAGCTCAGGGAGGACAGA
AACCTCCCGTGGAGCAGGAGGGCAAAAGCTCGCTTGATCTTGATTTTCAG
TATGAATACAGACCGTGAAAGCGGGGCCTCACGATCCTTCTGACTTTTTG
GGTTTTAAGCAGGAGGTGTCAGAAAAGTTACCACAGGGATAACTGGCTTG
TGGCG**GCCAAGCGTTCATA**

P450αρωματάση

GCCAGCAACTACTACAACAACAAGTATGGAGACATAGTCAGAGTATGG
ATCAATGGAGAGGAGACCCTCATACTCAGCAGGGCCTCAGTTGTGCACCA
TGTAATGAAGAATGGACATTATACTTCACGTTTTGGGAGCAAGCAGGGAC
TCAGCTGCATGGGCATGTATGAGAGAGGCATCATATTTAACAACAATGTA
ACTCTGTGGAAACAGATACGCAACTATTTCTCCAAAGCCCTGACAGGTCC
GGGCTTGCAGCAGACAGTGGAGGTTTGTGTCTCTTCCACACAGACTCACC
TGGACGACCTGGACAAGTTGGATAATGTGGATGTCCTCAGTTTGCTGCGC
TGCACAGTGGTCGACATCTCCAACAGACTCTTCCTGGGTGTACCTGTCAAT
GAGAAAGAGCTGCTGCTGAAGATTCAGAAGTATTTTGACACATGGCAGAC
TGTGCTGATCAAACCAGACATTTACTTCAAGTTTGACTGGATTACCCAGAG
GCATAAGACAGCAGCCCAGGAGTTGCAAGATGCCATAGAGAGTCTTGTAG
AACAGAAGAGGAGAGATATGGAGCAGGCAGATAAACTGGACATCAACTT
CACTGCAGACCTCATATTTGCACAGAACCGTGGCGAACTGACTGCTGAGA

ATGTGAGGCAATGTGTGTTGGAGATGGTGATTGCAGCACCAGACACTCTG
 TCTGTCAGCCTCTTCTTTATGCTGCTGCTCCTCAAACAGAATCCAGACGTG
 GAGCTGCAGCTGCTGCAGGAGATAGACACTGTTGTAGGTGAAAGACAGCT
 TCAGAACGGGGACCTTCAGAGGTTGCAGGTGCTGGAGAGCTTCGTCAACG
 AATGCTTGCGCTTCCACCCTGTGGTGGATTTCACCATGCGTCGAGCCCTGT
 CTGACGACATCATAGATGGCTACAGGGTACCGAAGGGCACAAATATAATT
 CTGAACACCGGCCACATGCACCGGACAGAGTTTTTCCTCAAACCCAATGA
 ATTTAATCTGGACAACTTTAAAAAAAATCCTCCTCGCCGCTACTTCCAGC
CATTCGGTTCAG

POMC

ATGGAGCATTTCGGGTGGGGGAAGCCTGTTGGACGAAAGCGCCGCCCG
 GTCAAAGTCTTCACCTCCAACGGCGTGGAGGAGGAGTCAGCCGAGGTTTT
 CCCTGAAGAGATGAGAAGGCGAGAGCTTGCCAGCGAGATTATAGCGGCA
 GAGGACGAGGAGAAGGCACAGGAGGTGGCGGAAGAGGAGCAGCTCCAC
 GAGAAGAAGGATGGCACGTACAAGATGAAGCACTTCCGCTGGGGCGGGC
 CGCCGGCCAGCAAAAAGCTACGGCGGCTTCATGA

B-aktin

GAGGAGCACCCTGTCCTGCTCACAGAGGCCCCCTGAACCCCAAAGCCA
 ACAGGGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTCGAGACCTTCAACACCCCCGCA
 ATGTACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTATGCCTCTGGTCGTACC
 ACTGGTATTGTTATGGACTCCCGTGATGGTGTGACCCACACAGTCCCCACT
 TATGAAGGCTATGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACTTGGCCGGC
 CGCGACCTCACAGACTACCTCATGAAGATCCTGACAGAGCGTGGCTACTC
 CTTACCAACACAGCCGAGAGGGAAATCGTGCGTGACATCAAGGAGAAG
 CTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGGTACTGCTGCTTCC
 TCCTCTTCCCTGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCCCACGGACAGGTCATCAC
 CATCGGCAATGAGAGGTTCCGTTGCCAGAGGCCCTCTTCCAGCCATCCTT
 CCTCGGTATGGAGTCCTGCGGAATCCATGAGACCACCTACAACAGCATCA
 TGAAGTGCGACGTCGACATCCGTAAGGACCTGTATGCCAACACTGTGCTG
TCTGGAGGTACCACC

Βιβλιογραφία

- Adkins-Regan, E., 1981. Early organization effects of hormones. An evolutionary perspective. In: Adler, N. T. (Ed), Neuroendocrinology of reproduction: Physiology and Behavior. Plenum, New York, 159-228.
- Alrubaian, J., Danielson, P., Fitzpatrick, M., Schreck, C., and Dore, R. M., 1999. Cloning of a second proopiomelanocortin cDNA from the pituitary of the sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Peptides* **20**, 431-436.
- Amemiya, Y., Takahashi, A., Dore, R. M., and Kawauchi, H., 1997. Sturgeon proopiomelanocortin has a remnant of gamma-melanotropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 452-456.
- Amemiya, Y., Takahashi, A., Meguro, H., and Kawauchi, H., 1999a. Molecular cloning of lungfish Proopiomelanocortin cDNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* **115**, 415-421.
- Amemiya, Y., Takahashi, A., Suzuki, N., Sasayama, Y., and Kawauchi, H., 2000. Molecular cloning of Proopiomelanocortin cDNA from an Elasmobranch, the stingray, *Dasyatis akajei*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **118**, 105-112.
- Arends, R. J., Vermeer, H., Martens, G., Leunissen, J. A., Wendelaar Bonga, S. E., and Flik, G., 1998. Cloning and expression of two proopiomelanocortin mRNAs in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Mol. Cell. Endocrinol.* **143**, 23-31.
- Balm, P. H. M., Gröneveld, D., Lamers, and Wenderaal Bonga, S. E., 1993. Multiple actions of melanotropic peptides in the teleost *Oreochromis mossambicus* (tilapia). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **680**, 448-451.
- Balm, P. H. M., and Pottinger, T. G., 1995. Corticotrope and melanotrope POMC-derived peptides in relation to interregal function during stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **98**, 279-288.
- Barton, B. A., and Iwama, G. K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effect of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.* **1**, 3-26.
- Blázquez, M., Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., and Donaldson, E., 1995. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyl-testosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture* **135**, 329-342.
- Blázquez, M., and Piferrer, F., 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mol. Cell. Endocrinol.* **219**, 83-94.
- Bruslé, J., and Bruslé, S., 1983. La gonadogenèse chez les poissons. *Nutr. Dev.* **23**, 453-491.
- Callard, G. V., Schlinger, B. A., and Pasmanik, M., 1990. Nonmammalian vertebrate models in studies of brain-steroid interactions. *J. Exp. Zool.* **4**, 6-16.
- Callard, G. V., Tchoudakova, A. V., Kishida, M., and Wood, E., 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of *cyp19* genes in teleost fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1623**, 1-10.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Blázquez, M., Ramos, J., Piferrer, F., and Donaldson, E. M., 1995. Sex control and ploidy manipulation in sea bass. Environmental Impacts of Aquatic Biotechnology, OCDE Publications, Paris, 43-54.
- Choi, I., Troyer, D. L., Cornwell, D. L., Kirby-Dobbels, K. R., Collante, W. R., and Simmen, F. A., 1997. Closely related genes encode developmental and tissue isoforms of porcine cytochrome P450 aromatase. *DNA Cell. Biol.* **16**, 769-777.
- Conley, A. J., and Walters, K. W., 1999. Aromatization. In: Knobil, E., Neill, J. D., Encyclopedia of reproduction, Academic Press, London, 280-291.
- Corbin, C. J., Khalil, M. W., and Conley, A. J., 1995. Functional ovarian and placental isoforms of porcine aromatase. *Mol. Cell. Endocrinol.* **113**, 29-37.
- Dalla Valle, L., Lunardi, L., Colombo, L., and Belvedere, P., 2002. European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) cytochrome P450arom: cDNA cloning, expression and genomic organization. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **80**, 25-34.
- Danielson, P. B., Alrubaian, J., Muller, M., Redding, J. M., and Dore, R. M., 1999. Duplication of the POMC gene in the paddlefish (*Polyodon spathula*): Analysis of γ -MSH, ACTH, and β -endorphin regions of ray-finned fish POMC. *Gen. Comp. Endocrinol.* **116**, 164-177.

- Danielson, P. B., and Dores, R. M., 1999. Molecular evolution of the Opioid/ Orphanin gene family. *Gen. Comp. Endocrinol.* **113**, 169-186.
- Dixon, A. F., and Nevison, C. M., 1997. The socioendocrinology of adolescent development in male Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Hormones & Behavior* **31**, 126-135.
- Dores, R. M., Gieseker, K., and Stevenson, T. C., 1994b. The posttranslational modification of β -endorphin in the intermediate pituitary of the toad, *Bufo marinus*, includes processing at a monobasic cleavage site. *Peptides* **15**, 1497-1504.
- Dores, R. M., Smith, T. R., Rubin, D. A., Danielson, P., Marra, L. M., and Youson, J. H., 1997. Deciphering posttranslational processing events in the pituitary of a neopterygian fish: Cloning of a gar proopiomelanocortin cDNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* **107**, 401-413.
- Dores, R. M., Sollars, C., Danielson, P., Lee, J., Alrubaian, J., and Joss J. M. P., 1999. Cloning of a proopiomelanocortin cDNA from the pituitary of the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*: analyzing trends in the organization of this prohormone precursor. *Gen. Comp. Endocrinol.* **116**, 433-444.
- Drouin, J., Nemer, M., Charron, J., Gagner, J. P., Jeannotte, L., Sun, Y. L., Therrien, M., and Tremblay, Y., 1989. Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene and repression by glucocorticoids. *Genome* **31**, 510-519.
- Forlano, P. M., Deitcher, D. L., Mayers, D. A., and Bass, A. H., 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J. Neurosci.* **21**, 8943-8955.
- García-Segura, L. M., Azcoitia, I., and Don Carlos, L. L., 2001. Neuroprotection by estradiol. *Prog. Neurobiol.* **63**, 29-60.
- Gelinas, D., Pitoc, G. A., and Callard, G. V., 1998. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Mol. Cel. Endocrinol.* **138**, 81-93.
- González, A., and Piferrer, F., 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **132**, 223-230.
- Golovine, K., Schwerin, M., and Vanselow, J., 2003. Three different promoters control expression of the aromatase cytochrome p450 gene (*cyp19*) in mouse gonads and brain. *Biol. Reprod.* **68**, 978-984.
- Gornati, R., Terova, G., Vigetti, D., Prati, M., Saroglia, M., and Bernardini, G., 2004. Effects of population density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) gene expression. *Aquaculture* **230**, 229-239.
- Gornati, R., Papis, E., Rimoldi, S., Terova, G., Saroglia, M., and Bernardini, G., 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene* **341**, 111-118.
- Hammer, R. P. Jr., Zhou, L., and Cheung, S., 1994. Gonadal steroid hormones and hypothalamic opioid circuitry. *Hormones & Behavior* **28**, 431-437.
- Harada, N., Utsimi, T., and Takagi, Y., 1993. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exon 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 11312-11316.
- Heinig, J. A., Keeley, F. W., Robson, P., Sower, S. A., and Youson, J. H., 1995. The appearance of proopiomelanocortin early in vertebrate evolution: cloning and sequencing of POMC from a lamprey pituitary cDNA library. *Gen. Comp. Endocrinol.* **99**, 137-144.
- Hilario, E., Lihmann, I., and Vaudry, H., 1990. Characterization of the cDNA encoding proopiomelanocortin in the frog, *Rana ridibunda*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 653-659.
- Ijiri, S., Berard, C., and Trant, J. M., 2000. Characterization of gonadal and extra-gonadal forms of the cDNA encoding the Atlantic stingray (*Dasyatis Sabina*) cytochrome P450 aromatase (CYP19). *Mol. Cel. Endocrinol.* **164**, 169-181.
- Kawauchi, H., Takahashi, A., and Abe, K., 1981. Gamma-melanotropin is not present in an N-terminal peptide of salmon proopiomelanocortin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **18**, 223-227.
- Kawauchi, H., 1988. The melanotropic peptides: Structure and chemistry. In "The Melanotropic Peptides" (M. E. Hadley, Ed.), Vol. 1, pp. 39-54. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kishida, M., and Callard, G. V., 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology* **142**, 740-750.

- Kitahara, N., Nishizawa, T., Iida, K., Okazaki, H., Andoh, T., and Soma, G., 1987. Absence of a γ -melanocyte-stimulating hormone sequence in proopiomelanocortin mRNA of chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Comp. Biochem. Physiol.* **91B**, 365-370.
- Lee, J., Lecaude, S., Danielson, P., Sollars, C., Alrubaian, J., Propper, C. R., Lihrmann, I., Vaudry, H., and Doros, R. M., 1999. Cloning of proopiomelanocortin from the brain of the African lungfish, *Protopterus annectens*, and the brain of the Western Spadefoot toad, *Spea multiplicatus*. *Neuroendocrinology* **70**, 43-54.
- Lephart, E. D., 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res. Rev.* **22**, 1-26.
- Levine, S., 2000. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior* **73**, 255-260.
- Martens, G. J. M., Civelli, O., and Herbert, E., 1985. Nucleotide sequence of cloned cDNA for pro-opiomelanocortin in the amphibian *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **260**, 13685-13689.
- Menuet, A., Anglade, I., Le Guevel, R., Pellegrini, E., Pakdel, F., and Kah, O., 2001. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha. *J. Comp. Neurol.* **462**, 180-193.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., and Moon, T. W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fisheries* **9**, 211-268.
- Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A. C. Y., Cohen, S. N., and Numa, S., 1979. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. *Nature* **288**, 610-613.
- Nebert, D. W., 1987. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 945-993.
- Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., et al., 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* **12**, 1-51.
- Okuta, A., Ando, H., Ueda, H., and Urano, A., 1996. Two types of cDNAs encoding proopiomelanocortin of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Zool. Sci.* **13**, 421-427.
- Pickering, A. D., Pottinger, T. G., and Sumpter, J. P., 1986. Independence of the pituitary-interrenal axis and melanotroph activity in the brown trout, *Salmo trutta* L., under conditions of environmental stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* **64**, 206-211.
- Pickering, A. D., Pottinger, T. G., and Sumpter, J. P., 1987. On the use of dexamethasone to block the pituitary-interrenal axis in the brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **65**, 346-353.
- Pieau, C., Girondot, M., Richard-Mercier, N., Desvages, G., Dorizzi, M., and Zaborski, P., 1994. Temperature sensitivity of sexual differentiation of gonads in the European pond turtle: hormonal involvement. *J. Exp. Zool.* **270**, 86-94.
- Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., Solar, I., Devlin, R., and Donaldson, E. M., 1994. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *J. Exp. Zool.* **270**, 255-262.
- Pottinger, T. G., Balm, P. H. M., and Pickering, A. D., 1995. Sexual maturity modifies the responsiveness of the pituitary-interrenal axis to stress in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **98**, 311-320.
- Pottinger, T. G., Carrick, T. R., Huges, S. E., and Balm, P. H. M., 1996. Testosterone, 11-ketotestosterone, and estradiol-17 β modify baseline and stress-induced interrenal and corticotropic activity in trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **104**, 284-295.
- Pottinger, T. G., and Pickering, A. D., 1990. The effects of cortisol administration in hepatic and plasma estradiol binding capacity in immature female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **80**, 264-273.
- Saillant, E., Fostier, A., Menu, B., and Chatain, B., 2001a. Sexual growth dimorphism in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **202**, 371-387.
- Salbert, G., Chauveau, I., Bonnet, G., Valotaire, Y., and Jegou, P., 1992. One of the two trout proopiomelanocortin messenger RNAs potentially encodes new peptides. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1605-1613.
- Shapiro, D. Y., 1980. Serial female sex changes after simultaneous removal of males from social groups of coral reef fish. *Science* **209**, 1136-1137.
- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarnah, B., Ito, Y., Fisher, C. R., and Michael, M. D., 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* **15**, 342-355.

- Simpson, E. R., Zhao, Y., Agarwal, V. R., Michael, M. D., Bulun, S. E., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Sun, T., Fisher, C. R., Qin, K., and Mendelson, C. R., 1997. Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm. Res.* **52**, 185-213.
- Simpson, E. R., 2000. Role of aromatase in sex steroid action. *J. Mol. Endocrinol.* **25**, 149-156.
- Škultétzová, I., and Ježová, D., 1999. Dissociation of changes in hypothalamic corticotropin-releasing hormone and pituitary proopiomelanocortin mRNA levels after prolonged stress exposure. *Mol. Brain Res.* **68**, 190-192.
- Slominski, A., Wortsman, J., Luger, T., Paus, R., and Solomon, S., 2000. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiological Reviews* **80**, 979-1020.
- Smith, A. I., and Funder, J. W., 1988. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr. Rev.* **9**, 159-179.
- Sumpter, J. P., Pickering, A. D., and Pottinger, T. G., 1985. Stress-induced elevation of plasma α -MSH and endorphin in brown trout *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **59**, 257-265.
- Takahashi, A., Amemiya, Y., Sarashi, M., Sower, S. A., and Kawauchi, H., 1995. Melanocortin and corticotropin are encoded on two distinct genes in the lamprey, the earliest evolved extant vertebrate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **213**, 490-496.
- Takahashi, A., Takasaka, T., Yasuda, A., Amemiya, Y., Sakai, M., and Kawauchi, H., 2000. Identification of carp proopiomelanocortin-related peptides and their effects on phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **10**, 273-284.
- Tchoudakova, A., and Callard, G. V., 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isoenzymes in brain and ovary. *Endocrinology* **139**, 2179-2189.
- Tong, S. -T., Chiang, E. F. -L., Hsiao, P. -H., and Chung, B. -C., 2001. Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish *cyp19* (P450 aromatase) genes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **79**, 299-303.
- Van Strein, F. J. C., Devreese, B., Van Beeumen, J., Roubos, E. W., and Jenks, B. G., 1996. Biosynthesis and processing of the N- terminal part of proopiomelanocortin in *Xenopus laevis*: Characterization of γ -MSH peptides. *J. Neuroendocrinol.* **7**, 807-815.
- Wendelaar Bonga, S. E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* **77**, 591-625.
- Winberg, S., and Lepage, O., 1998. Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression, and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. *Reg. Int. Comp. Phys.* **274**, 645-654.
- Yu, L., Romero, D. G., Gomez-Sanchez, C. E., and Gomez-Sanchez, E. P., 2002. Steroidogenic enzyme gene expression in the human brain. *J. Mol. Cel. Endocrinol.* **190**, 9-17.
- Zhang, Y., Zhang, W., Zhang, L., Zhu, T., Tian, J., Li, X., and Lin, H., 2004. Two distinct cytochrome P450 aromatases in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and differential mRNA expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **92**, 39-50.